

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Imunologie



Bc. David Adámek

Příprava rekombinantních forem extracelulární domény myších
leukocytárních receptorů z rodiny NKR-P1

Preparation of recombinant forms of the extracellular part of
mouse leukocyte receptors from NKR-P1 family

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Petr Man, PhD.

Konzultant: Mgr. Daniel Rozbeský

Praha 2012

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

.....

David Adámek

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych v první řadě rád poděkoval svému školiteli a vedoucímu práce RNDr. Petru Manovi, PhD. za ochotu, čas a cenné rady, které mi ochotně poskytoval a stejně tak mému konzultantovi Mgr. Danielu Rozbeskému, který mě seznámil s velkým množstvím technik a postupů.

Dík patří všem členům Laboratoře přirozené imunity, zejména bych chtěl poděkovat Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost pracovat v jeho laboratoři a Mgr. Danielu Kavanovi za mnohé rady a pomoc.

Rovněž bych chtěl poděkovat Doc. RNDr. Janu Černému, PhD. a jeho kolektivu za rady, ochotu a cennou spolupráci v přípravě značených buněčných preparátů a RNDr. Janu Svobodovi za asistenci při jejich mikroskopování.

V neposlední řadě patří můj dík mé rodině, přátelům a blízkým, kteří mne po celou dobu studia podporovali.

Pro grafickou úpravu některých obrázků v této práci byla jako inspirace použita kniha Abbas et al.: *Cellular and Molecular Immunology*^[1].

ABSTRAKTY

Myší receptory NK buněk patřící do rodiny NKR-P1 hrají roli v regulaci odpovědi těchto buněk z hlediska jejich aktivace, inhibice a produkce cytokinů. Tato diplomová práce se zabývá přípravou extracelulárních částí aktivačních receptorů mNKR-P1A a mNKR-P1C z myšího kmene C57BL/6. Cílem bylo připravit produkční vektor obsahující kódující sekvenci příslušných částí obou receptorů, optimalizovat jejich produkci v bakteriích *E. coli* a nalézt vhodný postup jejich renaturace a purifikace *in vitro*. Čisté proteinové preparáty byly následně ověřeny a analyzovány hmotnostní spektrometrií a rovněž značeny fluorescenční značkou za účelem hledání ligandu na buněčných preparátech. V budoucím výzkumu bude řešena struktura připravených proteinových preparátů a rovněž budou použity k hledání svých ligandů. Dané poznatky mohou v budoucnu dopomoci k lepšímu pochopení NK buněk.

Klíčová slova: *NK buňky, NKR-P1, myší receptory, renaturace proteinů, hmotnostní spektrometrie, fluorescenční značení, značení buněk*

Mouse NK cell receptors belonging to NKR-P1 family plays role in activation, inhibition and cytokine secretion by these cells. Aim of this thesis is preparation of extracellular parts of C57BL/6 mouse strain activating receptors mNKR-P1A and mNKR-P1C. Production vectors with coding sequences of both proteins were prepared. Next, optimization of production in *E. coli* was done and appropriate *in vitro* refolding and purification protocol were developed. Purified proteins were characterized by mass spectrometry and labeled by a fluorescent dye. Primary screening for potential ligand was performed. Further work will involve structural characterization of the receptors and identification of their ligands. These data may help to clarify the function of NK cells.

Keywords: *NK cells, NKR-P1, mouse receptors, protein refolding, mass spectrometry, fluorescent labeling, cell labeling*

OBSAH

Prohlášení	1
Poděkování	2
Abstrakty	3
Obsah	4
Seznam použitých zkratk	6
1. Literární úvod	8
1.1. Imunitní systém.....	8
1.2. NK buňky.....	9
1.2.1. Vývoj NK buněk.....	11
1.2.2. Licencování NK buněk.....	13
1.2.3. Paměť NK buněk.....	14
1.3. Funkce NK buněk v organismu.....	15
1.3.1. Cytotoxická subpopulace.....	16
1.3.2. Regulační subpopulace.....	17
1.4. Receptory NK buněk.....	18
1.4.1. Signalizační dráhy spojené s NK receptory.....	18
1.4.2. Ly49 rodina.....	18
1.4.3. KIR rodina.....	19
1.4.4. CD94/NKG2 receptory.....	19
1.4.5. NKG2D receptor.....	20
1.4.6. NKR-P1 rodina.....	21
2. Cíle práce	24
3. Materiál	25
3.1. Přístroje.....	25
3.2. Chromatografické kolony.....	26
3.3. Chemikálie.....	26
3.4. Enzymy.....	27
3.5. Inhibitory proteáz.....	28
3.6. Vektory.....	28
3.7. Kity.....	28
3.8. Média.....	28
3.9. Roztoky a puřry.....	28
3.10. Bakteriální kmeny.....	29
4. Metody	30
4.1. Molekulární techniky.....	30
4.1.1. Izolace mRNA ze slezinných buněk metodou TRI-reagent.....	30
4.1.2. Syntéza First-strand cDNA.....	31
4.1.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	31
4.1.4. Zaklonování sekvence kódující protein do vektoru.....	32
4.2. Rekombinantní exprese proteinů.....	33
4.2.1. Transformace kompetentních buněk.....	33
4.2.2. Selekce produkčního klonu.....	34
4.2.3. Optimalizace produkce proteinů.....	34
4.2.4. Určení místa exprese proteinu.....	35
4.2.5. Velkoobjemová produkce proteinů.....	35
4.2.6. Izolace inkluzních tělísek.....	35

4.2.7.	Rozpuštění inkluzních tělísek	36
4.3.	Renaturace proteinů.....	36
4.3.1.	Optimalizace renaturace proteinů	36
4.3.2.	Optimalizace renaturace mNKR-P1C	37
4.3.3.	Velkoobjemová renaturace	38
4.4.	Chromatografické metody	39
4.4.1.	Separace na ionexu	39
4.4.2.	Gelová filtrace	39
4.5.	Elektromigrační metody	40
4.5.1.	Diskontinuální SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	40
4.5.2.	DNA elektroforéza na agarosovém gelu	41
4.6.	Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové.....	42
4.7.	Metody hmotnostní spektrometrie.....	42
4.7.1.	Odsolení vzorku	43
4.7.2.	Stanovení monoizotopické hmotnosti proteinů	44
4.7.3.	Stanovení disulfidických můstků.....	44
4.8.	Fluorescenční značení rekombinantních proteinů	46
4.8.1.	Značení buněk rekombinantními proteiny s fluorescenční značkou.....	46
4.9.	Zahušťování proteinů	47
4.9.1.	Ultrafiltrace	47
4.9.2.	Centrifugační koncentrátoři	47
5.	Výsledky	48
5.1.	Úvod k výsledkům	48
5.2.	Příprava konstruktů	49
5.2.1.	Kontrola PCR amplifikace	49
5.2.2.	Restrikční analýza	50
5.3.	Produkce rekombinantních proteinů	51
5.3.1.	Selekce produkčních klonů	51
5.3.2.	Optimalizace produkce rekombinantních proteinů	52
5.3.3.	Určení místa exprese rekombinantních proteinů	53
5.4.	Optimalizace renaturace mNKR-P1A a mNKR-P1C izotypu 2.....	54
5.4.1.	Separace na Q-Sepharose.....	55
5.4.2.	Analýza frakcí získaných na Q-Sepharose	56
5.4.3.	Přečištění proteinových preparátů gelovou filtrací	57
5.4.4.	Ověření identity obou proteinů.....	58
5.5.	Optimalizace renaturace mNKR-P1C izotypu 1.....	59
5.5.1.	Analýza monomerního mNKR-P1C izotypu 1	60
5.5.2.	Optimalizace koncentrací redoxních partnerů v renaturačním pufru... 61	
5.5.3.	Modifikace renaturační metody	62
5.5.4.	Renaturace mNKR-P1C izotypu 1 metodou podle C. Weie et al.....	66
5.6.	Stanovení disulfidových vazeb v rekombinantních proteinech	67
5.7.	Značení buněk rekombinantními proteiny s fluorescenční značkou.....	69
6.	Diskuze.....	71
7.	Souhrn	76
8.	Citovaná literatura.....	77

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcN	acetonitril
ADCC	na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita (antibody-dependent cell cytotoxicity)
APC	antigen prezentující buňka (antigen presenting cell)
APS	proxodisíran amonný (ammonium persulfate)
BCR	B-buněčný receptor (B-cell receptor)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CCR7	CC-chemokinový receptor 7
CD	diferenční skupina (cluster of differentiation)
CHS	hapténem indukovaná kontaktní senzitivita (haptén-induced contact sensitivity)
CLP	lymfoidní progenitor (common lymphoid progenitor)
Clr	s C-lektinem spojený (C-type lectin related)
CMV	cytomegalovirus (HCMV – lidský, MCMV – myší, RCMV – krysí)
CTL	cytotoxický T-lymfocyt (cytotoxic T-lymphocyte)
CXCL6	ligand chemokinového receptoru CXCR6 (C-X-C ligand 6)
CXCR6	C-X-C chemokinový receptor typu 6 (C-X-C receptor 6)
DAMP	molekulární vzory spojené s nebezpečím (danger associated molecular patterns)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DISC	smrt indukující signální komplex (death inducing signaling complex)
DTT	dithiothreitol, redukční činidlo ((2S,3S)-1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELP	časný lymfoidní progenitor (early lymphoid progenitor)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FA	kyselina mravenčí (formic acid)
FT	Fourierova transformace (Fourier transformation)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HLA	lidský leukocytární antigen (human leucocyte antigen)
CHS	kontaktem vyvolaná hypersenzitivita (contact-induced hypersensitivity)
ICR	iontově-cyklotronová rezonance (ion-cyclotron resonance)
Id2	inhibitor transkripčních faktorů (inhibitor of DNA binding 2)
IFN	interferon
IL	interleukin
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ITAM	aktivační motiv receptorů imunitního systému založený na tyrosinu (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITIM	inhibiční motiv receptorů imunitního systému založený na tyrosinu (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)
KIR	imunoglobulinové receptory NK buněk (killer-cell immunoglobulin-like receptors)
LAK	lymfokiny aktivované zabíječské buňky (lymphokine-activated killer cells)
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LFA-1	leukocytární funkčně-asociovaný antigen 1 (lymphocyte function-associated antigen 1)

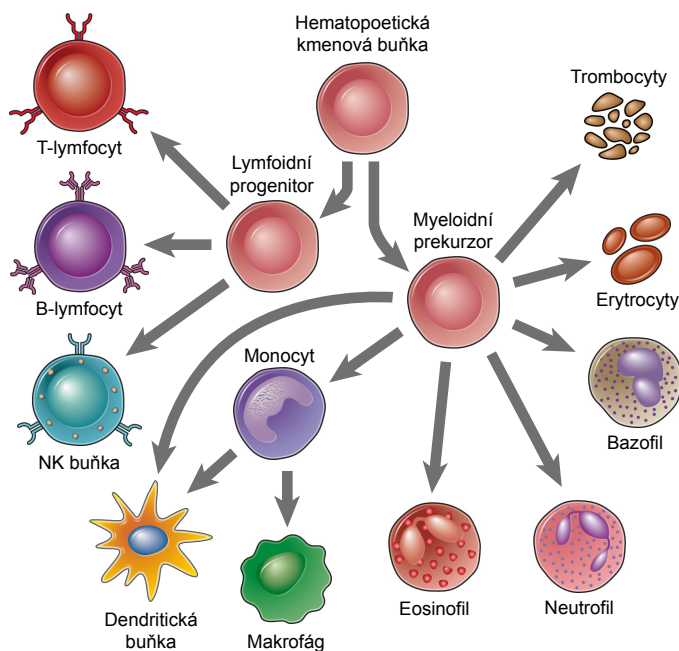
Lin	linie (lineage); Lin ^{+/-} vyjadřuje, že buňka má/nemá jasně daný směr vývoje
LLT1	lectin-like transcript 1, ligand hNKR-P1A
MALDI	desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MPR	receptor manózy 6-fosfátu (mannose 6-phosphate receptor)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NK	přirozeně zabíječská buňka (natural killer cell)
NKP	NK buněčný prekursor (NK cell precursor)
NKT	NK-T-buňka (NK-T-cell)
NLR	NOD-like receptory (NOD-like receptors)
PAMP	molekulární vzory spojené s patogeny (pathogen associated molecular patterns)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PEN5	označení epitopu PSGL-1
PMA	aktivátor buněk (phorbol myristate acetate)
PMSF	inhibitor proteáz fenylmethylsulfonyl fluorid (phenylmethylsulfonyl fluorid)
PSGL-1	P-selektinový glykoproteinový ligand 1 (P-selectin glycoprotein ligand-1)
RAG	rekombinační aktivační geny (recombination activating genes)
RCTL	homolog rClr-b (RCMV C-type lectin-like)
RLR	RIG-like receptory (RIG-like receptors)
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TAE	označení pufru v němž se provádí RNA/DNA elektroforéza (Tris-base, acetic acid, EDTA)
TCR	T-buněčný receptor (T-cell receptor)
TE	pufr, v němž se uchovává rozpuštěná plazmidová DNA (Tris-base, EDTA)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethan-1,2-diamin
TFA	kyselina trifluoroctová (trifluoroacetic acid)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TLR	Toll-like receptor
TNF	nádor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1. IMUNITNÍ SYSTÉM

Fyziologická funkce imunitního systému je poskytovat organismu ochranu před vnějšími patogeny, ale zároveň udržovat jeho homeostázu likvidováním odumřelých, či poškozených buněk tělu vlastních. Jedná se o nesmírně komplexní systém sestávající z mnoha odlišných populací a subpopulací buněk, které mezi sebou navzájem kooperují. Je obvyklé dělit tento systém na evolučně starší, *antigenně nespecifický* a evolučně mladší, *antigenně specifický*.

Antigenně nespecifický (vrozený) se vyznačuje rozpoznáváním evolučně konzervovaných cizorodých i tělu vlastních antigenů, k čemuž využívá širokou škálu rovněž evolučně konzervovaných receptorů, jako jsou TLR, NLR, RLR aj. Tyto rozpoznávané signály se označují jako DAMP, nebo PAMP a může se jednat antigeny



Obrázek 1-1: Hematopoeza. Zjednodušený model vývoje buněk imunitního systému. Nejsou vyobrazeny buněčné prekurzory, ani faktory důležité pro vývoj.

neurčených antigenů pomocí svých antigenně specifických receptorů TCR (T-lymfocyty) a BCR (B-lymfocyty). Velké specifity je dosaženo pomocí změny uspořádání genů pro tyto receptory (tzv. somatická rekombinace genů), díky čemuž je produkováno ohromné množství jednotlivých T a B-buněčných klonů s rozdílnými specifitami vůči nejrůznějším antigenům.

z virů, bakterií, parazitů, či buněk tělu vlastních, například fosfatidylserin při detekci apoptotických tělísek, která rozpoznávají makrofágy a pohlcují je. Z buněk do vrozené části imunitního systému patří hlavně fagocytující buňky (neutrofil a jejich tkáňová forma makrofágy), žírné buňky, bazofily, eosinofily, NK buňky, ale také antigen prezentující buňky – dendritické buňky.

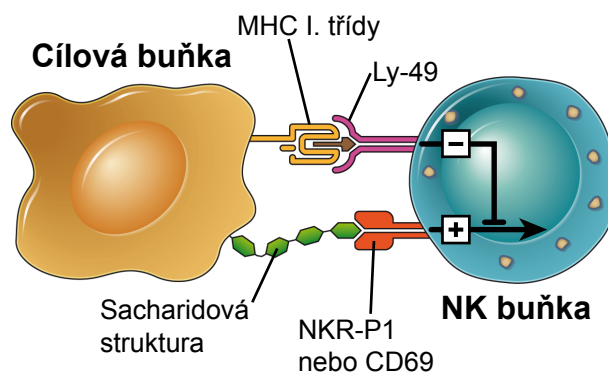
Antigenně specifický je naopak založen na rozpoznávání předem

Všechny populace buněk imunitního systému se vyvíjí v kostní dřeni z hematopoetických kmenových buněk, kde mohou dozrát (B-lymfocyty), nebo kostní dřeň opustí v raném vývojovém stádiu a dozrávají v jiných částech těla (T-lymfocyty v thymu; NK buňky v sekundárních lymfoidních orgánech). Schéma tohoto vývoje je uvedeno na *obrázku 1-1* na straně 8. Důležitým mechanismem udržujícím toleranci k vlastním antigenům je pozitivní a negativní selekce T a B-lymfocytů, která zabraňuje dozrávání autoreaktivních klonů těchto buněk. O toleranci k vlastním tkáním se také stará subpopulace regulačních T-lymfocytů (T_{reg}). Pravděpodobně tak činí sekrecí cytokinů (IL-10 a TGF- β), či buněčným kontaktem s autoreaktivní buňkou^[1].

1.2. NK BUŇKY

NK buňky byly popsány už v roce 1975 jako velké granulární buňky. Jsou třetí hlavní lymfoidní populace^[2]. Tvoří 10 – 15 % z celkového množství v krvi cirkulujících lymfocytů. Jsou schopny rozlišit mezi normálními a abnormálními buňkami, jako jsou nádorové a virově infikované, a cytotoxicky je usmrtit^[3]. Produkují řadu důležitých imunoregulačních cytokinů^[4]. Zprostředkují rovněž mezibuněčný kontakt dalším leukocytům, čímž mohou aktivovat mechanismy adaptivní části imunitního systému^[5].

Název těchto buněk je zkratkou anglických slov „natural killer cells“, neboli „přirozeně zabíječské buňky“. Na rozdíl od dalších příslušníků lymfoidní linie (T a B-lymfocytů) nepotřebují pro užití svých efektorových funkcí předchozí stimulaci a mohou vykonávat tyto funkce nezávisle. Svými receptory rozpoznávají na povrchu cílové buňky poměr jí exprimovaných antigenů. NK buňka tak přijímá určité množství aktivačních a inhibičních signálů. Je-li tento poměr ku prospěchu inhibičního signálu, je cílová buňka ponechána žít. Převáží-li však aktivační signál, je cílová buňka cytotoxicky usmrcena^[6]. Tento mechanismus (*obrázek 1-2*) slouží jako ochrana před intracelulárními parazity a mutacemi, protože při těch se často vyskytují abnormálně exprimované antigeny, nebo naopak chybí.



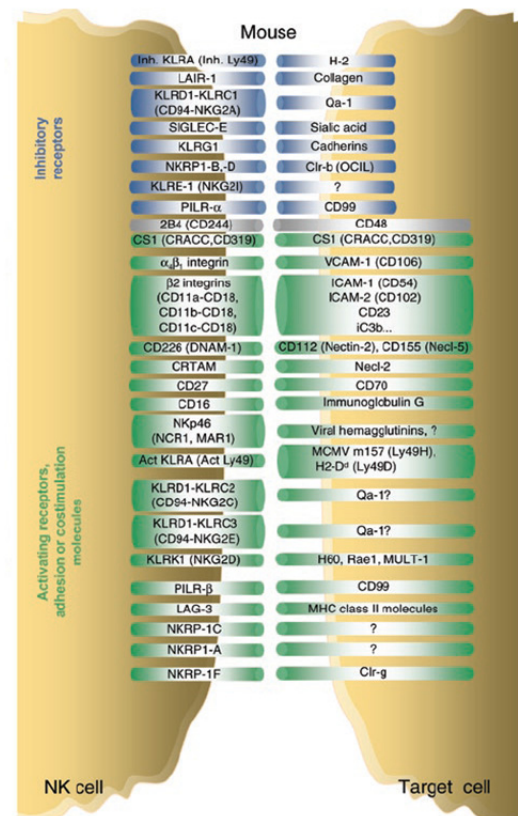
Obrázek 1-2 [6]. upraveno: **Zjednodušený model procesu NK-buněčného rozpoznávání.** NK buňka přijímá dva druhy signálů: „zabij“ (+) a „nezabíjej“ (-). O konečném důsledku rozhodne poměr těchto signálů, přičemž signál „-“ inhibuje tvorbu signálu „+“.

Častou strategií některých nádorů a například herpesvirů, je snižování povrchové exprese MHC glykoproteinů I. třídy [7]. Naopak cytomegalovirus (CMV) zvyšuje expresi *homologů* MHC I. třídy a tím se snaží efektorové funkce NK buňky utlumit [8]. Tímto homologem je jeho DNA kódovaný virový protein m157, který se váže jednak na aktivační receptor Ly-49H (jež exprimují myši C57BL/6), ale i inhibiční Ly-49I – u určitých kmenů myši exprimujících m157 si tak virus získá rezistenci [9].

Jak již bylo řečeno, k rozpoznávání antigenů NK buňkám slouží velké množství povrchových receptorů, které však nejsou vytvářeny *somatickou mutací*, ale jsou kompletně kódovány DNA. NK buňky na rozdíl od T a B-lymfocytů postrádají RAG rekombinázy, které jsou zodpovědné za přeskupování genů a vzniku velkého množství specifit T a B-buněčných receptorů [10]. Tento receptorový rozpoznávací systém je často označován jako „molekulární zip“ a je vyobrazen na *obrázku 1-3* [11].

Dalším příkladem jejich příslušnosti do lymfoidní řady je sdílení cytotoxických mechanismů s CD8⁺ cytotoxickými T-lymfocyty (CTL), které též užívají granzymy a perforin [12].

Původní snaha klasifikace NK buněk na základě specifického povrchového antigenu nebyla úspěšná, protože NK buněčné receptory se nacházejí i na jiných buňkách (například na $\gamma\delta$ TCR⁺ T-lymfocytech a aktivovaných CD8⁺ T-lymfocytech) a nemají proto specifický antigen [12]. Za zatím nejspecifičtější marker je považován receptor NK1.1 na CD3⁻ NK buňkách myši C57BL/6 (B6) [13]. Dále jsou významné expresí molekuly CD56 a CD16, naopak neexprimují CD3, čímž se liší od cytotoxických T-lymfocytů a NKT buněk [5; 7]. Obvykle jsou NK buňky definovány fenotypem CD16⁺ CD56⁺ CD3⁻. Expresí povrchových molekul se však mění v průběhu vývoje a podle lokalizace a funkce buněk v těle. V organismu zastávají nejen *cytotoxické* funkce, ale rovněž *regulační*; tyto funkce jsou rozebrány v kapitole 1.3.



Obrázek 1-3 [11]: Přehled známých receptorů a jejich ligandů, jež jsou součástí „molekulárního zipu“.

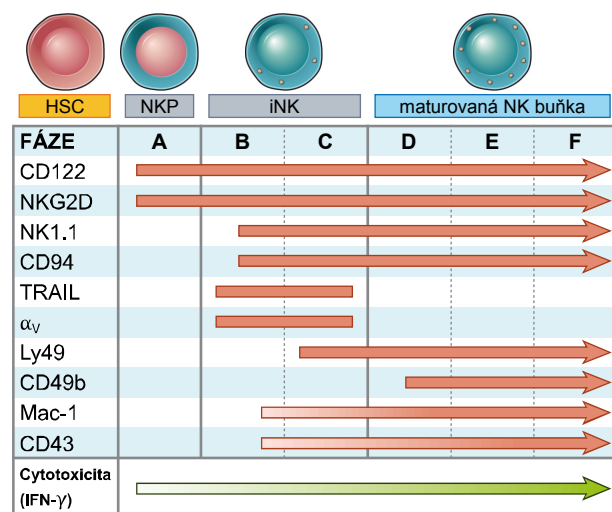
1.2.1. Vývoj NK buněk

Obecně je za místo prvotní diferenciaci NK buněk označována kostní dřeň^[14; 15]. Není však dodnes jasné, kde přesně dochází k jejich dalšímu vývoji a maturaci^[16]. Některé modely směřují vývoj zejména do kostní dřeně^[17; 18], další model spíše do sekundárních lymfoidních orgánů^[4]. Všechny však dělí tento proces do několika fází, jež jsou specifické výskytem určitých znaků.

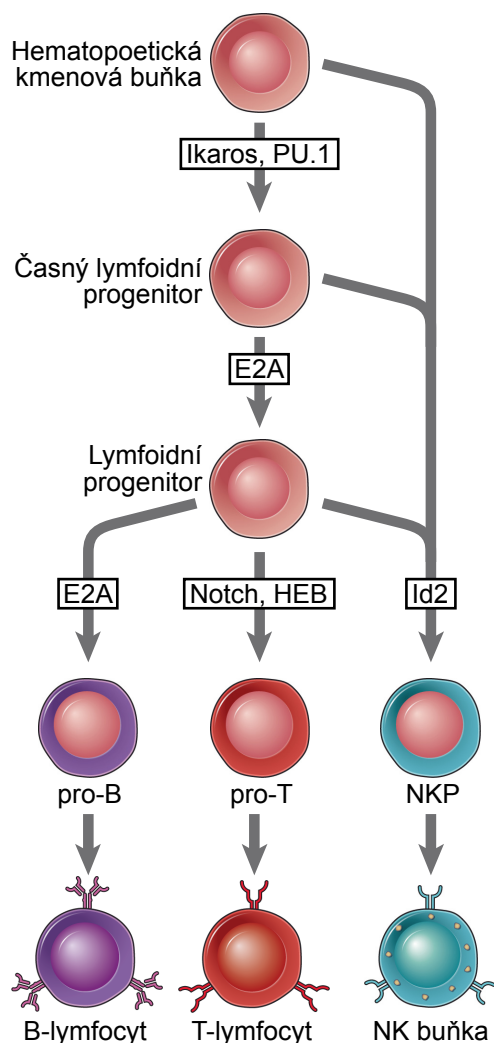
Starší model vývoje NK buněk v *kostní dřeni* odvodil ze studie provedené na myším kmeni C57BL/6 *Yokoyama et al*^[18], který jej rozdělil do pěti fází, počínaje NK buněčným prekurzorem (NKP). V první fázi je NKP charakteristický expresí β -podjednotky receptoru pro IL-2 a IL-15 (tedy IL-2-IL-15R β , neboli CD122); tento fakt plně souhlasí s nezbytností IL-15 během rané fáze vývoje NK buněk^[19]. Prekurzory neexprimují receptor NK1.1 a CD49b (α_2 integrin párující se s β_1), na který lze vázat monoklonální protilátku DX5. Na základě předešlých údajů lze označit NKP jako CD122⁺ NK1.1⁻ DX5⁻^[20]. Během druhé a třetí fáze NK buňka získá své specifické receptory NK1.1, CD94-NKG2 a Ly49, stejně jako některé integriny (α_V , CD49b a Mac-1). Ve čtvrtém vývojovém kroku začne buňka silně proliferovat a pak zakončí svůj vývoj v páté fázi, kdy je schopna produkovat IFN- γ , uplatnit své cytotoxické funkce a silně exprimuje Mac-1 a CD43^[18].

Novější model podle *Di Santa*^[17], který rovněž vychází z myšího modelu, v podstatě doplňuje a vylepšuje starší s menšími rozdíly. Vývoj NK buněk dělí do šesti fází (*obrázek 1-4*) namísto pěti, ale také na základě exprese povrchových molekul. NKP definuje jako Lin⁻ CD122⁺ NKG2D⁺ NK1.1⁻ DX5⁻ bez exprese dalších povrchových znaků NK buněk. Vznik NKP z hematopoetických kmenových buněk je dán rovnováhou transkripčních faktorů E2A a HEB, které směřují

lymfoidní prekurzor k vývoji v T, nebo B-lymfocyt a jejich inhibitoru Id2, který dává vzniknout NKP^[17; 21]. Tento proces je znázorněn na *obrázku 1-5* na straně 12 a je závislý na signálech zvenčí^[22; 23]. Zároveň reprezentuje plasticitu (schopnost měnit své



Obrázek 1-4: Schéma zobrazující důležité antigeny v šestifázovém modelu vývoje NK buněk podle Di Santa^[17], upraveno.



Obrázek 1-5: Vývoj NK buněk z hlediska transkripčních faktorů [17], upraveno. Vývoj lymfocytů je dán rovnováhou transkripčních faktorů (černé rámečky) E2A, HEB a inhibitoru Id2, který směřuje vývoj k NK buňkám.

„zaměření“ v průběhu vývoje) lymfoidních prekurzorů [17]. V dalším vývoji NK buněk se rovněž uplatňují transkripční faktory GATA-3 (regulace exprese CD11b, CD43, Ly49; důležitý pro produkci IFN- γ maturovanou NK buňkou), IRF-2, T-bet (podobný účinek) a u maturovaných NK buněk pak MITF, MEF a CEBP- γ , které jsou důležité pro správnou produkci cytokinů a cytotoxicitu [24; 25]. Tento model připouští sekundární lymfoidní orgány jako místo konečné maturace NK buněk [17].

Třetí model popisuje z hlediska vývoje NK buněk kostní dřeň jako místo, kde se zrodí pouze *pre-NK* buňky, které následně putují do *sekundárních lymfoidních orgánů*, kde dokončí svůj vývoj [17; 26]. Hematopoietická kmenová buňka nejprve podstoupí dvoufázový vývoj vlivem růstových faktorů FL (ligand Flt3), KL a interleukinů 6 a 7 z $CD34^+ CD122^-$ (*pro-NK*) na $CD34^+ CD122^+$ (*pre-NK*), která je schopna se diferencovat po stimulaci IL-15 [27]. První fázi z pěti, *pro-NK* buňky, charakterizuje fenotyp $CD34^+ CD117^- CD94^-$, přičemž po stimulaci výše zmíněnými faktory dají vzniknout *pre-NK*

buňkám (fáze 2) s fenotypem $CD34^+ CD117^+ CD94^-$. V tomto stádiu jsou prekurzory ještě značně plastické a schopné přesmyknout na jiný typ buňky (T-lymfocyty, myeloidní DC) [28]. Naopak ve fázi 3 už nevykazují plasticitu žádnou. Rovněž ztratí velké množství antigenů původně sdílených s ostatními vývojovými liniemi. Stále nejsou schopny cytotoxicity, produkce IFN- γ a neexprimují většinu důležitých receptorů. Jejich fenotyp je $CD34^- CD117^+ CD94^-$. Ve čtvrté fázi je opět snížena exprese CD117 a zvyšuje se exprese receptorů CD94/NKG2A a transkripčního faktoru T-bet [29]. Problematika se zde přesouvá k expresi dvou povrchových molekul: CD56 a CD16. V lidské krvi lze identifikovat dvě subpopulace: $CD56^{světlé} CD16^{tmavé/-}$ a $CD56^{tmavé} CD16^{světlé}$ [30]. Ačkoliv NK buňka s fenotypem $CD56^{tmavá}$ se vyvíjí z $CD56^{světlé}$ [31], je možný i proces opačný [26], a

proto zůstává nejasné, která subpopulace tvoří konečné stádium vývoje, nebo jestli jsou vývojově rovnocenné.

1.2.2. Licencování NK buněk

Jak už bylo řečeno, NK buňky rozpoznávají svými aktivačními a inhibičními receptory poměr antigenů na povrchu cílové buňky. Pokud chybí inhibiční (například MHC I. třídy), nebo naopak přebývají aktivační signály, buňka je cytotoxicky usmrcena. Tato takzvaná „*missing-self*“ hypotéza však selhává v těch případech, kdy je exprese inhibičních molekul naopak zvýšena. V takovém případě by NK buňka nebyla schopna cílovou buňku usmrtit. Zmíněnou strategii využívá například cytomegalovirus, který je však NK buňkami úspěšně likvidován^[32]. Ukazuje se, že ve vývoji NK buněk hraje podstatnou roli takzvané *licencování*^[33].

Během maturace může a nemusí být NK buňka vystavena tělu vlastním MHC I. třídy, které rozpozná svými inhibičními receptory. Takové „setkání“ je důležité pro funkci těchto inhibičních receptorů v budoucím rozpoznávání cílových buněk. Pokud je jim NK buňka vystavena, získá licenci a vyskytuje se jako „typická“ maturovaná NK buňka, jež zabíjí buňky s utlumenou expresí MHC I. třídy. Není-li však těmto antigenům během maturace vystavena, licenci nezíská a vyznačuje se velice nízkou expresí inhibičních receptorů rozpoznávající MHC třídy I. Během vývoje NK buňky tak vznikají dvě subpopulace, přičemž nelicencovaný typ byl ještě donedávna považován za imunologicky nevýznamný^[34].

Licencování je spojeno s aktivací aktivačního receptoru během vývoje^[33]. Studie provedená na receptoru Ly49A myši B10.D2 naznačila, že je v licencování nezbytná role ITIM signalizačního motivu^[34].

Licencované a nelicencované NK buňky se z hlediska svých efektorových funkcí neliší^[35]. Po stimulaci *in vitro* vysokými dávkami IL-2 a IL-18, nebo PMA a ionomycinem byly jejich odpovědi srovnatelné^[34; 36]. Oba typy jsou rovněž schopné produkovat ve stejné míře IFN- γ ^[35].

Rozdíly se však projevují během rozpoznávání. Jako příklad uveďme MCMV napadenou buňku exprimující m157, který je homologem MHC glykoproteinů I. třídy a je rozpoznáván aktivačními receptory Ly49C/I a inhibičním Ly49H. Je-li NK buňka licencovaná (Ly49C/I⁺ a Ly49H⁺), je její odpověď slabá, protože signalizace skrze inhibiční receptor inhibuje cytotoxické funkce. Není-li však inhibiční Ly49C/I přítomen, buňka je nelicencovaná a exprimuje pouze Ly49H, pak dojde k silné odpovědi^[32].

Navzdory těmto faktům mají MHC I. třídy-deficientní myši nereaktivní NK buňky. Jsou tedy zřejmě udržovány v klidu neznámým mechanismem, který je rovněž neznámo jak prolomen v případě virové infekce, kdy začnou rozpoznávat MHC I. třídy v souladu s „missing-self“ hypotézou^[37].

1.2.3. Paměť NK buněk

Imunitní paměť je považována za schopnost T a B-lymfocytů, které díky svým antigenně specifickým receptorům rozpoznávají velké množství antigenů, mohou diferencovat se na paměťovou formu a napomáhat tak rychlejší a účinnější odpovědi při dalším vystavení patogenu. Na této vlastnosti je vystaven i celý koncept očkování^[38]. Oproti tomu, receptorový repertoár NK buněk je značně omezen, protože není vytvářen V(D)J rekombinací z důvodu chybějících RAG-rekombináz^[10]. Přesto odpověď malé části populace NK buněk na opakované vystavení antigenu nese známky adaptivní imunity a to jak v reakci na hapteny, tak virové antigeny^[39; 40]. Tyto údaje byly získány převážně na myším modelu (C57BL/6 a BALB/c). Není známo, jestli se NK buněčná paměť vyskytuje i u jiných organismů^[41]. U lidí byly pozorovány NKG2C⁺ NK buňky ještě 60 dní po infekci hantavirem^[42], což naznačuje možnou schopnost dlouhodobého přežívání takto specifických subpopulací. Nicméně důkaz pro specifitu, nebo jejich klonalitu neexistuje^[41].

Důkazy (u myší) pro tuto schopnost byly získány zejména na modelu haptenem-vyvolané kontaktní senzitivity (CHS) a díky některých virovým antigenům. U CHS je nositelem paměti zřejmě malá subpopulace (méně než 10 %) jaterních NK buněk s fenotypem CD11b, CD90 a CD186 (CXCR6)^[39; 43]. Přítomnost ligandu CXCL16, který se váže na CXCR6 je nezbytná pro jejich přežití. Tento ligand se vyskytuje v jaterních sinusoidech^[43]. Rovněž účinnější jsou NK buňky nesoucí receptory Ly49C a Ly49I, které rozpoznávají MHC glykoproteiny I. třídy. Z toho lze usuzovat, že licencované NK buňky jsou mnohem efektivnější v odpovědi na hapteny. Přesto se neprokázala přímá spojitost s výskytem těchto receptorů a pamětí, protože ty se mohou vyskytovat rovněž na slezinných buňkách, které však paměť v odpovědi na hapteny nevykazují^[41].

Indukce NK buněčné paměti v případě CHS probíhá pravděpodobně následovně: do pokožky proniknuvší haptenu se kovalentně naváže na buňky a proteiny pojiva, kde se také naváže na antigen-prezentující buňky, které následně migrují do lymfatických uzlin. Tam jsou rovněž atrahovány NK buňky, které zde rozpoznají APC nesoucí haptenu^[44]. Po rozpoznání antigenu a s tím spojenou aktivací migrují do jater, kde se usídlí

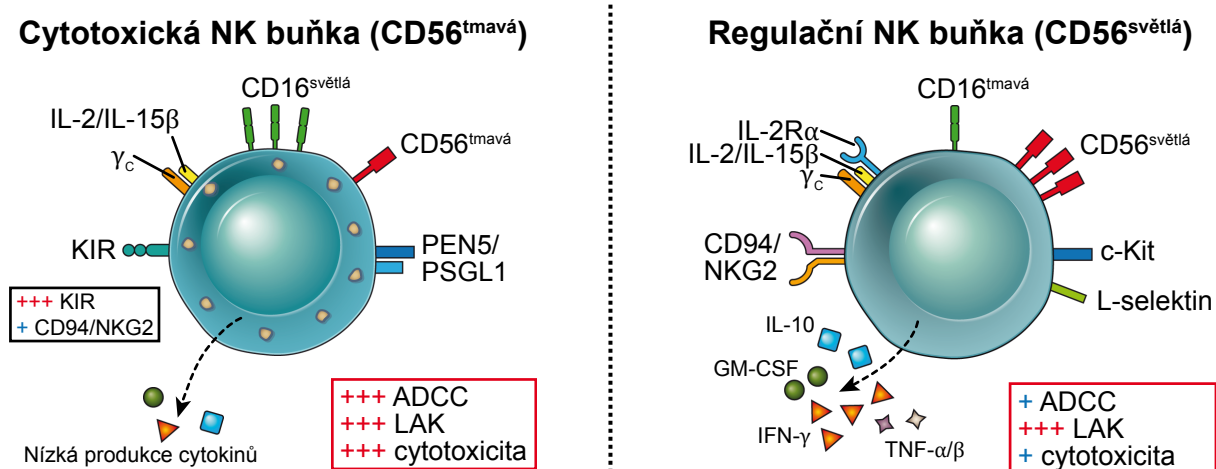
v sinusoidách v kontaktu s CXCL16. Po opětovném vystavení haptenu migrují do zasažených míst a plní své efektorové funkce [41].

Zdokumentována je i paměť na virové antigeny, zejména myší cytomegalovirus (MCMV), jehož protein m157 rozpoznává receptor Ly49H (u myši C57BL/6). Po rozpoznání m157 antigenu receptorem Ly49H⁺ NK buňkami je u nich zaznamenána velká klonální expanze [40], přičemž buňky pak přežívají několik měsíců. Při přenosu do naivní myši jsou tyto dárcovské paměťové NK buňky asi desetkrát účinnější, než naivní Ly49H⁺ z hostitelské myši [40].

V souladu s předchozími fakty bylo zjištěno, že MCMV-paměťové NK buňky mají na rozdíl od naivních NK buněk větší expresi receptoru Ly49H, ale ne ostatních aktivačních receptorů. Zároveň byl jejich fenotyp více podobný maturovaným NK buňkám, nežli naivním. Z tohoto lze usoudit, že jejich paměť je nejspíše dána *posunem* prahu citlivosti na antigen – buňky s vyšší expresí Ly49H se snadněji aktivují [40].

1.3. FUNKCE NK BUNĚK V ORGANISMU

NK buňky tvoří v těle heterogenní populaci dvou dobře definovaných subpopulací a to CD56^{světlé} CD16^{tmavé/-} a CD56^{tmavé} CD16^{světlé} [17]. Zastávají v organismu vícero úloh, jíž určuje právě četnost výskytu těchto molekul (CD56 a CD16) na jejich povrchu – z pohledu exprese těchto molekul o nich mluvíme jako o *světlých* (vysoká exprese), nebo *tmavých až negativních* (nízká až žádná exprese) [45]. Tyto subpopulace jsou znázorněny na obrázku 1-6.



Obrázek 1-6 [30], upraveno: Schematické znázornění dvou hlavních subpopulací NK buněk s nejvýznamnějšími antigeny.

Většinou subpopulaci (95 % v krvi a 85 % ve slezině) tvoří *cytotoxické* NK buňky s fenotypem CD56^{tmavé} CD16^{světlé}, které produkují perforin a granzymy [46]. Druhá subpopulace je tvořena NK buňkami s fenotypem CD56^{světlé} CD16^{tmavé/-}, jež mají spíše *imunomodulační funkce* a produkují řadu cytokinů [45].

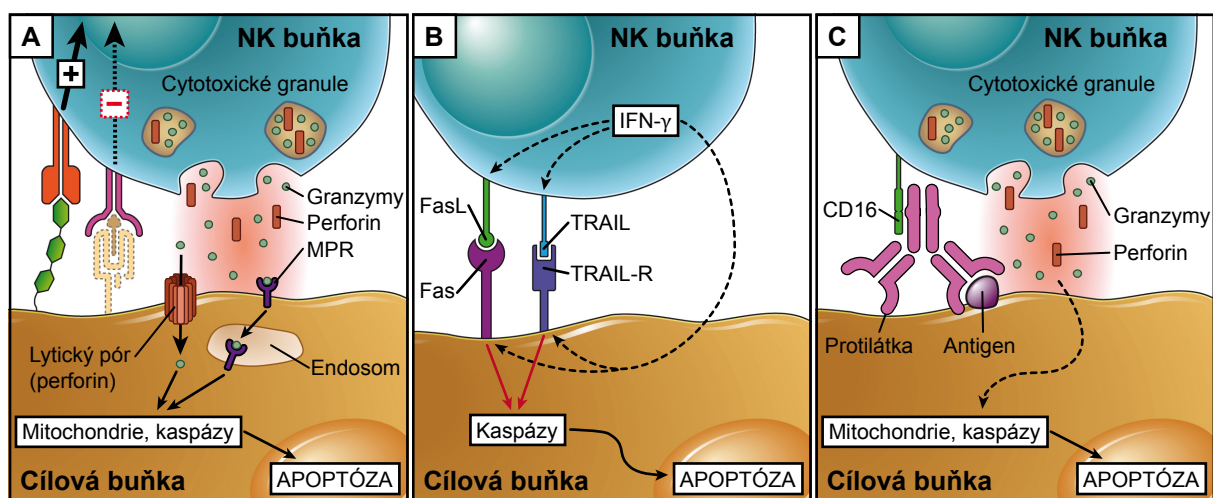
Obě subpopulace zřejmě migrují i do odlišných částí těla. CD56^{světlé} exprimují L-selektin (CD62L) a chemkinový receptor CCR7 umožňující jim migraci do sekundárních lymfoidních orgánů. CD56^{tmavé} exprimují LFA-1 a PEN5, která ve spojení s PSGL-1 umožňuje naopak vazbu na CD62L.

CD16 se vyskytuje v různé míře takřka na všech maturovaných NK buňkách [4]. Oproti tomu CD56 má na NK buňkách neznámou funkci – pravděpodobně se účastní mezibuněčné komunikace. Její exprese však dobře koreluje s funkcí NK buňky [26].

Zároveň je možný přesmyk z jedné této subpopulace (CD56^{světlé} CD16^{tmavé/-}) na druhou pod vlivem IL-2 z T-lymfocytů v lymfatických uzlinách, kdy dojde ke změně fenotypu na CD56^{tmavé} a CD16^{světlé} [26].

1.3.1. Cytotoxická subpopulace

Cytotoxickou formu tvoří asi 90 % z celkového počtu NK buněk a jsou charakteristické fenotypem CD56^{tmavé} CD16^{světlé}. Exprimují středně afinní receptor pro IL-2 a reagují na tento cytokin jen velmi slabě, neexprimují c-Kit receptor tyrosin-kinázu. Po stimulaci IL-2 však zvyšují své cytotoxické funkce v porovnání s druhou subpopulací. Jsou špatnými producenty imunoregulačních cytokinů a to i po stimulaci monocytárními cytokiny [30].



Obrázek 1-7: Tři hlavní mechanismy usmrcení cílové buňky NK buňkou. Pokud cílové buňce chybí obvyklé antigeny (MHC I. třídy aj.) je NK buňka aktivována a usmrtí cílovou buňku (A) [47], upraveno, apoptózu může navodit rovněž skrze „receptory smrti“ jejichž expresi reguluje IFN- γ (B) [47], upraveno, třetí možností je navázání Fc části IgG na CD16 (C), jež spustí podobné cytotoxické funkce jako ty, jež jsou popsány na obrázku A.

Své cytotoxické funkce mohou zprostředkovat několika mechanismy (*obrázek 1-7* na straně 16): produkcí perforinu a granzymů (a), interakcí s „receptory smrti“ (b), nebo v závislosti na protilátkách (c), kdy jsou schopny receptorem CD16 (FcγRIII) vázat Fc část IgG a tím aktivovat efektorové funkce (ADCC) [26; 46].

Hlavní složkou cytotoxických granulí v cytoplazmě NK buněk jsou perforin, který slouží k tvorbě pórů v membráně a umožňuje granzymům dostat se do cílové buňky, a granzymy (serinové proteázy), které se také mohou do buňky dostat pomocí receptory zprostředkované endocytózy (například manózu 6-fosfát vážící receptor). Granzymy zprostředkují smrt buňky přímo (štěpením lamin a tvorbou zlomů v ssDNA, jako například granzym A), nebo nepřímo (aktivací, respektive štěpením kaspáz) [47].

Druhou strategií této populace je exprese některých membránových, či rozpustných forem cytokinů indukujících buněčnou smrt. Patří mezi ně TRAIL a FasL (CD95L). Tyto ligandy aktivují „receptory smrti“ asociované s DISC doménou a konečným důsledkem je aktivace kaspáz následovaná apoptózou. Buňky produkují TRAIL (člen rodiny TNF) jednak jako membránově vázaný glykoprotein II. třídy, nebo jako rozpustnou formu. Jeho exprese se silně zvyšuje po stimulaci IL-2 a IL-15. Ačkoli receptor pro FasL (Fas) není konstitutivně exprimován cílovými buňkami, NK buňky jeho expresi indukují sekrecí IFN-γ a následně tak spouští apoptózu svým FasL [47].

1.3.2. Regulační subpopulace

Subpopulace regulačních NK buněk má fenotyp CD56^{světlé} a CD16^{tmavé/-}. Tvoří pouze asi 10 % z celkového počtu NK buněk a vyznačuje se produkcí řady cytokinů (po stimulaci monokiny), jako je zejména významná produkce IFN-γ a dále TNF-α, TNF-β, GM-CSF a IL-10. Díky této produkci jsou důležité v prvních chvílích vniknutí patogenu do organismu. Silně odpovídají na stimulaci IL-2 (díky konstitutivní expresi vysokoafinního heterotrimerního IL-2Rαβγ_c je dostatečná pikomolární koncentrace), kteroužto odpověď také umocňuje vazba ligandu na c-Kit receptor tyrosin-kinázu [26]. Po této stimulaci expandují jak *in vivo*, tak *in vitro*, ale s nízkými projevy cytotoxicity. Vyskytují se hlavně v lymfatických uzlinách (desetinásobně víc, než v krvi), kde mohou být aktivovány T-lymfocyty, jež produkují IL-2.

Z hlediska receptorové výbavy exprimují zejména CD94/NKG2 a méně než 10 % cytotoxické subpopulace exprimuje KIR receptory.

V této subpopulaci exprimuje ještě určitá část buněk molekulu CD8 (exprese je však různá u člověka, myši a krysy). Obě sub-subpopulace mají srovnatelnou cytotoxickou

kapacitu a schopnost produkce IFN- γ , avšak pouze CD8⁻ jsou schopny produkovat cytokiny typu 2^[48].

1.4. RECEPTORY NK BUNĚK

Receptory účastníci se NK-buněčného rozpoznávání lze dělit podle dvou úhlů pohledu. Jednak podle funkce na *inhibiční* a *aktivační*, nebo podle struktury na *C-lektinové* a *imunoglobulinové*. Geny kódující C-lektinové receptory se nachází v genovém komplexu zvaném *NK receptorový genový komplex* (NKC)^[49] a geny pro imunoglobulinové receptory v *leukocytárním Ig-like receptorovém komplexu* (LRC)^[50].

1.4.1. Signalizační dráhy spojené s NK receptory

Všechny dosud popsané inhibiční receptory NK buněk obsahují ve své cytoplazmatické části inhibiční motiv zvaný ITIM, který lze sekvenčně popsat: (I/V/L/S)-x-T-x-x-(L/V), kde *x* značí libovolnou aminokyselinu a lomítko odděluje aminokyseliny, jež mohou na daném místě v sekvenci být^[12]. Po navázání ligandu na receptor dojde k fosforylaci tyrosinu v ITIM doméně fosfokinázami rodiny Src, což umožní funkce fosfatáz SHP-1 a SHP-2 a SHIP (která se procesu účastní, závisí na receptoru)^[51]. Cílem této signalizace je zamezit uvolnění Ca²⁺ z endoplazmatického retikula, například defosforylací inositol trisfosfátů na inositol bisfosfáty (SHIP), nebo snížením fosforylace dalších signálních proteinů (SHP-1 a SHP-2)^[12].

Aktivační receptory nemají vlastní signalizační domény a jsou proto asociovány s adaptorovými proteiny mající ve své struktuře ITAM motiv (sekvence [D/E]-x-x-T-x-x-[L/I]-x₆₋₈-T-x-x-[L/I]). Mezi tyto proteiny patří například DAP12, Fc ϵ RI- γ , CD3 a ζ řetězec^[12]. Dojde-li k navázání ligandu na receptor, dojde k fosforylaci tyrosinu v ITAM motivu a kinázy Syk a ZAP-70 dále umožní signalizační kaskádu vedoucí mj. k uvolnění Ca²⁺ z endoplazmatického retikula, degranulaci a transkripčním dějům^[12].

1.4.2. Ly49 rodina

Jedná se o rodinu *C-lektinových* transmembránových proteinů typu II. Geny kódující tuto rodinu se u myší nachází na chromozomu 6 a v jednotlivých kmenech se značně liší. Nejlépe jsou popsány u kmene C57BL/6 a 129/J. Mimo myší byly nalezeny i u koní. U primátů a jiných savců (například kočka a pes), včetně člověka byl nalezen pouze nefunkční pseudogen^[12]. Většina genů kóduje inhibiční receptory s ITIM motivem, ale

například Ly49D a Ly49H jsou aktivační receptory signalizující přes DAP12 (ITAM motiv). Aby mohlo dojít k jejich navázání na MHC I. třídy, je nutná přítomnost *libovolného* peptidu vázaného na MHC [52].

U inhibičních forem těchto receptorů je jejich účel zřejmý – ochrana před autoreaktivitou. Avšak v případě aktivačních forem je situace složitější. Ly49D se účastní odhojení aloštěpů kostní dřeně. Rozeznává MHC I. třídy H-2D^d a aloreaktivitu NK buněk spouští ve spojení s ostatními Ly49 receptory rozpoznávající další alelické formy MHC I. třídy [53]. Funkce receptoru Ly49H ve spojení s MCMV už byla diskutována v předchozím textu – uplatňuje se tedy v ochraně proti virem napadeným buňkám.

1.4.3. KIR rodina

KIR receptory jsou rodina *imunoglobulinových* transmembránových proteinů typu I, čítající 15 genů a dva pseudogeny na lidském chromosomu 19q13.4 s obdobnou funkcí jakou má Ly49 [12]. Podle počtu imunoglobulinových domén v molekule proteinu se dělí na KIR2D (2 imunoglobulinové domény) a KIR3D (3 imunoglobulinové domény). Zároveň mohou mít dlouhou (L) intracelulární doménu obsahující 1 – 2 ITIM motivy, nebo krátkou (S) bez ITIM, ale s lysinem v transmembránové části, který je zodpovědný za asociaci s adaptorovým proteinem DAP12 (ITAM motiv) [12].

Ligandy inhibičních forem jsou HLA-A, HLA-B a HLA-C. Ukazuje se, že KIR se pravděpodobně účastní některých autoimunitních onemocnění. Například exprese KIR2DS2 je spojena s revmatoidní artritidou [54] a KIR2DS1 se vznikem lupénky [55]. Naopak pozitivní roli má KIR3DS1 ve spojení s alelou HLA-Bw4, se kterým jedinci nakažení virem HIV žijí déle; KIR3DS1 pravděpodobně rozpoznává některý HIV-kódovaný protein [12].

Počet genů kódujících tyto receptory u jedince je různý a v populaci jsou nejběžnější dva haplotypy, označované jako A, nebo B. Nicméně do dnešních dnů bylo identifikováno celkem 37 haplotypů. Rovněž byly nalezeny u krav, koní, a dokonce byly podobné nalezeny i u myši. Aktivační a inhibiční formy jsou kódovány vlastními geny a nejedná se o produkty post-transkripčního sestřihu [12].

1.4.4. CD94/NKG2 receptory

C-lektiny CD94 i NKG2 jsou transmembránové proteiny typu II. Kódující geny se nachází u člověka na chromosomu 12p12.3 – p13.2 a chromosomu 6 u myši. Silně konzervovaný CD94 je geneticky příbuzný čtyřem NKG2 genům u člověka (A, C, E a F;

forma B je pouze sestřihovou variantou formy A) a třem u myši (A, C, E) ^[12]. Na rozdíl od Ly49 a KIR tedy nedisponují rozsáhlým polymorfismem ^[56]. Rozpoznávají nepříliš běžné MHC I. třídy, jako jsou HLA-E (člověk) a Qa1 (myš) ^[57]. Exprese těchto neobvyklých ligandů je spjata s expresí běžných MHC I. třídy a nepřímo tak mohou kontrolovat expresi i těchto ostatních MHC glykoproteinů ^[12].

CD94 se může na povrchu buňky vyskytovat jako kovalentní homodimer, nebo heterodimer s NKG2A či C. NKG2A obsahuje ITIM motiv a komplex CD94/NKG2A slouží jako inhibiční receptory, na rozdíl od CD94/NKG2C, který je asociován s DAP12 a jedná se tudíž o aktivační receptory. Jejich exprese může být regulována IL-15, TGF- β a IL-12 ^[12]. Při infekci lidským cytomegalovirem (HCMV) dochází k expresi virového proteinu UL40, který je podobný HLA-E a je tudíž tímto heterodimerem rozpoznáván (podobný princip jako Ly49H u myši), v tom může spočívat jedna z funkcí tohoto receptorového komplexu – ochrana před maskovací strategií zmíněného viru ^[58].

1.4.5. NKG2D receptor

Tento transmembránový protein typu II byl popsán jako součást rodiny receptorů NKG2. Od ostatních členů se však liší – sekvenčně a typem rozpoznávaných ligandů. Na povrchu buněk se vyskytuje jako kovalentní homodimer ^[59]. Jedná se tak vlastně o samostatný receptor, který ani v člověku, ani myši není prakticky polymorfní. Je to aktivační receptor ^[12].

Komplex tohoto receptoru s adaptorovými proteiny se u myši a člověka liší. Homodimer tvoří dvě sestřihové varianty – dlouhý NKG2D-L a krátký NKG2D-S, přičemž dlouhá varianta ve člověku asociuje *pouze* s DAP10, zatímco v myších se vyskytuje s vazbou na DAP10 i DAP12. Aktivací receptoru se spouští buněčné cytotoxické mechanismy a v některých případech produkce cytokinů ^[12]. Rozpoznává antigeny strukturně podobné MHC glykoproteinům, ty ale nejsou kódovány geny v MHC genovém komplexu s výjimkou ligandů MICA a MICB ^[60], a neslouží k vazbě antigenů ^[12].

Jedna z jeho rolí je nejspíše v obraně proti virům. Lidský a myší cytomegalovirus kódují proteiny, které značně snižují expresi některých jeho ligandů. Dále se podílí na regulaci proliferace cytotoxických T-lymfocytů. Výzkum však naznačuje, že má i významnou roli v autoimunitních onemocněních ^[12].

1.4.6. NKR-P1 rodina

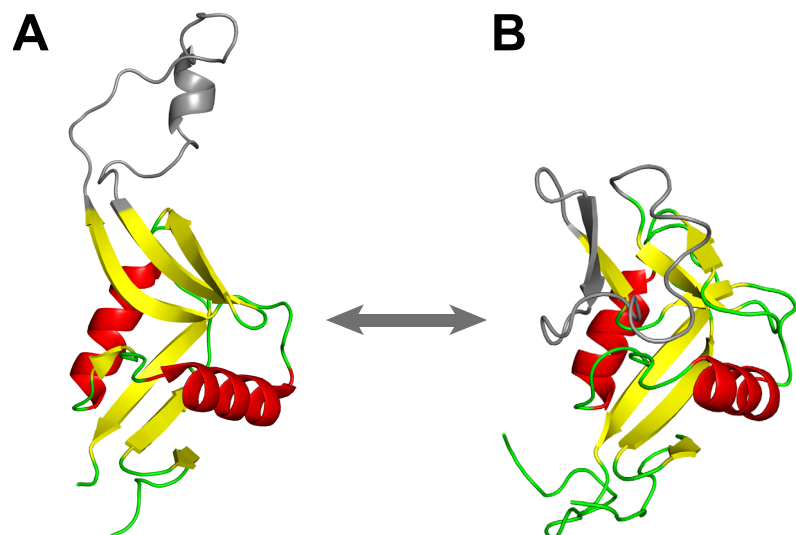
Doposud bylo identifikováno celkem sedm genů této receptorové rodiny: *Nkrp1a, b, c, d, e, f* a *g*^[61]. Nacházejí se v NKC genovém komplexu u člověka na chromosomu 12 a u myši na chromosomu 6. Jejich exprese, či přítomnost v genofondu se však značně liší u člověka a hlodavců. Zatímco ti disponují několika formami, člověk exprimuje pouze jednu a to NKR-P1A, někdy označovanou pouze jako hNKR-P1^[62]. Jedná se o aktivační, nebo inhibiční transmembránové glykoproteiny typu II a strukturně o C-lektiny. Této rodině receptorů patří označení CD161. Jednotlivé formy jsou popsány v následujících odstavcích.

1.4.6.1. NKR-P1A

Tato forma je exprimována jak v hlodavcích, tak v člověku, kde je někdy nazýván pouze jako NKR-P1. Lidský je z hlediska aminokyselinové sekvence ze 46 % homologní s hlodavčím. Rovněž se liší v expresi a funkci. hNKR-P1A je exprimován pouze určitou subpopulací lidských NK buněk a na přibližně 25 %, preferenčně paměťových, CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytech. Oproti tomu hlodavčí T-lymfocyty zřídka tento receptor exprimují a naopak je přítomen na takřka všech jejich NK buňkách^[62]. Fyziologický ligand není pro myši ani krysí formu znám, avšak výzkum naznačuje, že by se mohlo jednat o sacharidové struktury^[63; 64]. Ligandem lidského hNKR-P1A je protein LLT1. Pakliže tento ligand interaguje s hNKR-P1A na povrchu NK buněk, utlumují se jejich cytotoxické funkce a sekrece IFN- γ .

Naopak v přítomnosti TCR na T-lymfocytech se produkce IFN- γ zvyšuje^[65].

mNKR-P1A^{B6} je jediným zástupcem rodiny NKR-P1 u kterého je rozřešena část jeho struktury – lektinové domény (obrázek 1-8). Jeho struktura se liší v krystalu a roztoku zejména polohou chlopně (obrázek 1-8, šedý úsek), která v krystalu slouží k interakci s vedlejší



Obrázek 1-8: Trojrozměrná struktura extracelulární lektinové domény mNKR-P1A^[66; 67], upraveno. Struktury byly řešeny krystalograficky (A) a pomocí NMR v roztoku (B). Smyčka (šedá barva) má při různých podmínkách (v krystalu a roztoku) různé polohy, což může naznačovat její roli v rozpoznávání ligandu.

molekulou. To naznačuje, že by mohla mít funkci v rozpoznávání ligandu ^[66; 67].

mNKR-P1A je spolu s mNKR-P1C a F aktivační receptor, bez vlastní ITAM signální domény – obsahuje však nabitou aminokyselinu v transmembránové doméně (arginin), pomocí které pravděpodobně interaguje s aktivačním adaptorovým proteinem FcεRIγ obsahujícím ITAM (jak bylo popsáno u mNKR-P1C) ^[12; 68]. Lidský NKR-P1A rovněž neobsahuje signální doménu, avšak ani argininový zbytek ^[62]. Pravděpodobně aktivuje svou cytoplazmatickou částí kyselou sfingomyelinázu, jež je důležitá pro tvorbu *N*-acyl-sfingosinu (ceramid), což je druhý posel účastnící se indukce apoptózy, proliferace a diferenciace ^[69].

1.4.6.2. NKR-P1B a D

Je rovněž označován jako NK1.1 antigen (spolu s NKR-P1C, jejich C-lektinová doména je z hlediska aminokyselinové sekvence z 96 % identická), protože v myším kmeni Sw se na něj váže monoklonální protilátka PK136 ^[70]. Naopak u myší BALB/c se na NKR-P1B/C tato protilátka neváže. Ukázalo se, že je to z důvodu substituce serinu (S₁₉₁) za threonin, kde tato substituce nejspíše sníží afinitu z důvodu specifické *O*-glykosylace ^[61]. NKR-P1B i D jsou inhibiční receptory s vlastní ITIM doménou ^[70].

Po dlouhou dobu nebylo jasné, jestli NKR-P1B^{BALB/c} a NKR-P1D^{B6} nejsou jen odlišné alelické formy téhož receptoru, což podporoval i fakt, že sdílí stejný ligand – Ocl/Clr-b, který je identický pro oba kmeny B6 a BALB/c. Nakonec však bylo prokázáno, že se skutečně jedná o odlišné receptory ^[61].

Clr-b hraje zřejmě důležitou roli protinádorové imunitě. Jeho exprese je totiž velmi často snížena na nádorových buňkách, jež jsou rozpoznávány NK buňkami ^[71]. Zároveň tento ligand, respektive jeho homolog, využívá krysí cytomegalovirus (RCMV) pro svou ochranu. V napadené buňce snižuje expresi rClr-b a na jeho úkor exprimuje protein RCTL, který kóduje svou virovou DNA. Jelikož RCTL rovněž interaguje s rNKR-P1B, utlumí efektorové funkce NK buňky a není zneškodněn ^[72].

1.4.6.3. NKR-P1C

Často nazýván jako NK1.1, je vůbec první identifikovaný člen z této rodiny a je hojně používán jako specifický marker pro NK buňky u myších kmenů CE, B6, NZB, C58, Ma/My, ST, SJL, FVB, kde se pro jeho detekci používá specifická monoklonální protilátka PK136. Na rozdíl od výše jmenovaných myších kmenů jej však nelze touto protilátkou detekovat u kmenů BALB/c, AKR, CBA, C3H, DBA a 129 ^[61]. Je exprimován mimo jiné NKT buňkami a částí T-lymfocytů. Není znám jeho fyziologický ligand.

Jedná se o aktivační receptor s argininovým zbytkem v transmembránové části, která asociuje s adaptorovým proteinem FcεRIγ, a signalizuje posléze prostřednictvím Syk kináz^[73]. Když je tento protein zesítněn monoklonální protilátkou, dochází u NK buňky k silné produkci IFN-γ^[68].

1.4.6.4. NKR-P1E, F a G

NKR-P1E je zřejmě pseudogen a není jak u BALB/c tak u B6 myši přepisován^[61].

NKR-P1F je aktivační receptor exprimovaný na všech NK buňkách myší C57BL/6, ale ne na T-lymfocytech. Jeho aktivační potenciál je sporný, protože neovlivňuje ani cytotoxicitu, ani expresi IFN-γ. Je také exprimován na krysích NK buňkách^[74]. Jeho ligandem je Clr-g, Clr-c a Ocilrp2^[61; 75].

NKR-P1G byl u myší nejprve označen za pseudogen, jež nemá žádnou známou signalizační sekvenci, či interakční oblast s adaptorovým proteinem^[70]. Ukázalo se ale, že je přítomen na NKR-P1D⁺ a NKR-P1D⁻ NK buňkách myší C57BL/6. U krys je rovněž exprimován u určité subpopulace NK buněk. Je to inhibiční receptor, strukturně podobný NKR-P1F a rozpoznává i ligandy ze stejné rodiny: Clr-f, Clr-g a Clr-d/x^[74].

2. CÍLE PRÁCE

- Příprava produkčních vektorů.
- Optimalizace produkce a renaturace proteinů *in vitro*.
- Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií.

3. MATERIÁL

3.1. PŘÍSTROJE

- Analytické váhy AL54-IC *Mettler Toledo, ČR*
- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Centrifuga J-6M *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga J-6M *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga Spectrafuge 16M *Edison, USA*
- Centrifuga Z 233 MK-2 *Hermle, Německo*
- Centrifuga Z 383K *Hermle, Německo*
- Centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra *Millipore, USA*
- Čtečka gelů G-Box *Syngene, USA*
- Dialyzační trubice Spektra/Por *Spektrum Laboratories, USA*
- Hmotnostní spektrometr APEX-Qe FTMS *Bruker Daltonics, Německo*
- HPLC systém BioSys 510 *Beckman Coulter, USA*
- Kapalinový chromatograf Agilent 1200 *Agilent Technologies, Německo*
- Konfokální mikroskop Olympus FV1000 SIM *Olympus, USA*
- Magnetická míchačka MM 2A *Laboratorní přístroje Praha, ČR*
- microHPLC systém Agilent 1200 *Agilent, USA*
- Mrazicí box na –80°C *Revco, USA*
- PCR cyklátor Mastercycler personal *Eppendorf, Německo*
- pH metr Φ200 *Beckman Coulter, USA*
- Předvážky HF-1200G *AND, USA*
- Sapphire Microplate Reader *Tecan, Švýcarsko*
- Souprava pro DNA elektroforézu *Sigma-Aldrich, USA*
- Souprava pro SDS-PAGE elektroforézu *Bio-Rad, USA*
- Souprava pro ultrafiltraci *Sigma-Aldrich, USA*
- Spektrofotometr DU-70 *Beckman Coulter, USA*
- Thermomixer comfort *Eppendorf, Německo*
- Třepačka na Erlenmayerovy baňky *Gallenkamp Ltd., UK*
- Třepačka na zkumavky BigGer Bill *Thermolyne, USA*
- Ultracentrifuga Optima LE-80K *Beckman Coulter, USA*
- Ultrafiltrační membrány *Sigma-Aldrich, USA*
- Ultrazvuková lázeň Sonorex *Bandelin, Německo*
- Ultrazvuková lázeň *KRAINTEK, Slovensko*
- Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 *Cole-Parmer Instrum. Co., USA*
- Vakuová odparka Speedvac *Jouan, Francie*
- Vortexový mixér Zx³ *Scientifica, Itálie*
- Zdroj deionizované vody MilliQ *Millipore, USA*

3.2. CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY

- | | |
|---|----------------------------------|
| ▪ Kolona s reverzní fází pro LC-MS
(<i>velikost částic 3 μm; velikost pórů 200 Å; 0,2 × 150 mm; nosič MAGIC C18</i>) | <i>Michrom Bioresources, USA</i> |
| ▪ Kolony MicroTrap s reverzní fází | <i>Michrom Bioresources, USA</i> |
| ▪ Q-Septraosa | <i>GE Healthcare, Německo</i> |
| ▪ Superdex 200 HR 10/30 | <i>GE Healthcare, Německo</i> |
| ▪ Superdex 75 HR 10/300 | <i>GE Healthcare, Německo</i> |

3.3. CHEMIKÁLIE

Veškeré chemikálie byly v čistotě a kvalitě dostačující experimentům.

- | | |
|--|-------------------------------|
| ▪ 2-merkapt ethanol | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Acetonitril | <i>Merck, Německo</i> |
| ▪ Agar | <i>Oxoid, USA</i> |
| ▪ Agarosa | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Akrylamid | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Azid sodný | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Bacto-tryptone | <i>Oxoid, USA</i> |
| ▪ Bacto-yeast extract | <i>Oxoid, USA</i> |
| ▪ Bromfenolová modř | <i>Serva, Německo</i> |
| ▪ Chlorid hořečnatý | <i>Lachema, ČR</i> |
| ▪ Coomassie Brilliant Blue G-250 | <i>Serva, Německo</i> |
| ▪ Coomassie Brilliant Blue R-250 | <i>Serva, Německo</i> |
| ▪ Cystamin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Cysteamin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Činidlo pro stanovení proteinů podle Bradfordové | <i>Bio-Rad, Německo</i> |
| ▪ DAPI | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Dihydrogenfosforečnan sodný | <i>Lachema, ČR</i> |
| ▪ dNTP | <i>Promega, USA</i> |
| ▪ DTT | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ EDTA | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Ethanol | <i>Lachema, ČR</i> |
| ▪ Ethidium bromid | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Ethylmorfolin | <i>Merck, Německo</i> |
| ▪ Glycerol | <i>Lachema, ČR</i> |
| ▪ Glycin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Guanidin-HCl | <i>Jersey Lab Supply, USA</i> |
| ▪ HEPES | <i>Serva, Německo</i> |
| ▪ Hovězí sérový albumin (BSA) | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |

▪ Hydrogenfosforečnan sodný	<i>Lachema, ČR</i>
▪ Hydroxid sodný	<i>Lachema, ČR</i>
▪ Chlorid sodný	<i>Lachema, ČR</i>
▪ Chlorid vápenatý	<i>Lachema, ČR</i>
▪ IPTG	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Isopropanol pro LC-MS	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
▪ Isopropanol	<i>Lachema, ČR</i>
▪ Kanamycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Kyselina chlorovodíková	<i>Lachema, ČR</i>
▪ Kyselina mravenčí pro LC-MS	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
▪ Kyselina octová	<i>Lachema, ČR</i>
▪ Kyselina trifluoroctová pro LC-MS	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
▪ L-arginin-HCl	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Močovina	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Mowiol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ <i>N,N'</i> -metylen-bis-akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Oligo-(dT) ₂₀	<i>New England Biolabs, USA</i>
▪ Peroxodisíran amonný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Sacharóza	<i>Lachema, ČR</i>
▪ SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
▪ SDS-PAGE standardy	<i>Serva, Německo</i>
▪ TCEP	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ TEMED (1,2-bis(dimethylamino)ethan)	<i>Serva, Německo</i>
▪ Tetracyklin	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
▪ TRI-reagent	<i>MRC, USA</i>
▪ Tris	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
▪ Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Voda pro hmotnostní spektrometrii	<i>J.T.Baker, USA</i>
▪ Ostatní chemikálie	<i>Lachema, ČR</i>

3.4. ENZYMY

Pufry byly zpravidla dodávány spolu s enzymem od stejného výrobce, nebo je jejich složení uvedeno v následujícím textu.

▪ AspN	<i>Roche, Švýcarsko</i>
▪ DNAsa I	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ GluC	<i>Roche, Švýcarsko</i>
▪ <i>HindIII</i> restriční endonukleáza	<i>New England Biolabs, USA</i>
▪ <i>NdeI</i> restriční endonukleáza	<i>New England Biolabs, USA</i>
▪ RNAsa I	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Superscript III RT	<i>Invitrogen, USA</i>
▪ T4 DNA ligáza	<i>Stratagene, USA</i>

- Trypsin *Roche, Švýcarsko*

3.5. INHIBITORY PROTEÁZ

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

3.6. VEKTORY

- pET-30a-(+)
 - pCR 2.1-TOPO
- Novagen, USA*
Invitrogen, USA

3.7. KITY

- Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit *Invitrogen, USA*
- Alexa Fluor 568 Protein Labeling Kit *Invitrogen, USA*
- Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit *Geneaid, Taiwan*
- Geneaid Plasmid Maxi Kit *Geneaid, Taiwan*
- High-Speed Plasmid Mini Kit *Geneaid, Taiwan*

3.8. MÉDIA

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

3.9. ROZTOKY A PUFRY

- **Akrylamidová směs pro přípravu SDS-PAGE gelů:** 29% (w/v) akrylamid; 1% (w/v) *N,N'*-metylen-bis-akrylamid
- **Barvicí roztok pro SDS-PAGE:** 45% (v/v) methanol; 10% (v/v) kyselina octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- **Dialyzační pufr:** 9 mM NaCl; 15 mM Tris-HCl; 1 mM NaN₃; pH = 9,0
- **Guanidinový pufr na rozpuštění inkluzních tělísek:** 6 M guanidin-HCl; 100 mM Tris-HCl; 100 mM DTT; pH = 8,0
- **Chromatografický pufr (gelová filtrace):** 150 mM NaCl; 15 mM Tris-HCl; 1 mM NaN₃; pH = 9,0
- **Chromatografický pufr (ionexová ch. pufr A):** 9 mM NaCl; 15 mM Tris-HCl; 1 mM NaN₃; pH = 9,0

- **Chromatografický pufr (ionexová ch. pufr B):** 1 M NaCl; 15 mM Tris-HCl; 1 mM NaN₃; pH = 9,0
- **Močovinový pufr na rozpuštění inkluzních tělísek:** 8 M močovina; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl; 50 mM KH₂PO₄; pH = 11,0
- **Odbarvovací roztok pro gely z SDS-PAGE:** 35% ethanol, 10% kyselina octová
- **PBS:** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 0,2 mM KH₂PO₄; pH = 7,4
- **Promývací pufr (izolace inkluzních tělísek):** 50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 mM 2-merkapt ethanol; 1 mM NaN₃; pH = 7,4
- **Pufr pro štěpení trypsinem a GluC:** 50 mM ethylmorfolin-acetát; 10 % acetonitril; pH = 8,27
- **Pufr s detergentem (izolace inkluzních tělísek):** 0,5% (w/v) Triton X-100; 50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 mM 2-merkapt ethanol; 1 mM NaN₃; pH = 7,4
- **Sacharózový lyzační pufr (izolace inkluzních tělísek):** 25% (w/v) sacharóza; 50 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 1 mM NaN₃; pH = 7,4
- **SDS-PAGE pufr:** 10 mM Tris-HCl; 250 mM glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH = 8,3
- **Solvent A pro LC-MS:** 0,2% (v/v) kyselina mravenčí; 4% (v/v) acetonitril; 1% 2-propanol (v/v)
- **Solvent B pro LC-MS:** 0,16% (v/v) kyselina mravenčí; 90% (v/v) acetonitril; 5% 2-propanol (v/v)
- **TAE pufr:** 2 M Tris-HCl; 1 M kyselina octová; 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% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) bromfenolová modř; pH = 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE (redukující):** 50 mM Tris-HCl; 12% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) bromfenolová modř; 100 mM DTT; pH = 6,8

3.10. BAKTERIÁLNÍ KMENY

- **BL21-Gold(DE3);** Genotyp: *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS*
(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^R *gal λ(DE3) endA Hte* Stratagene, USA
- **NovaBlue;** Genotyp: *E. coli endA1 hsdR17*(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺)
supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA⁺B⁺
lacI^q ZΔM15::Tn10] (Tet^R) Novagen, USA

4. METODY

Většina metod dále uvedených je založena na dlouholeté zkušenosti naší laboratoře a jejich členů s výrobou rekombinantních proteinů a také na metodickém manuálu ^[76].

4.1. MOLEKULÁRNÍ TECHNIKY

4.1.1. Izolace mRNA ze slezinných buněk metodou TRI-reagent

Jedná se v podstatě o fenol-chloroformovou extrakci závislou na pH. Vzorek homogenizovaný v roztoku TRI-reagent se rozdělí po přidání chloroformu a centrifugaci na dvě fáze: organickou a vodnou. Vodná fáze obsahuje RNA, která se následně vysráží izopropanolem a přečistí. Organická fáze pak obsahuje DNA a proteiny, které se projeví jako sraženina mezi fázemi. Důvodem je rozdělovací rovnováha nukleových kyselin mezi vodnou a organickou fází v závislosti na pH. DNA je v této vodné fázi rozpustná při pH 7,5 – 8 a RNA už při pH 4 – 6. Fenol, kromě úpravy pH, zajišťuje rovněž denaturaci proteinů, které se tak snadněji oddělí od nukleových kyselin.

Neprodleně po usmrcení myši byla slezina homogenizována za stálého chlazení na ledu v 1 ml roztoku TRI-reagent. Homogenát byl přenesen do sterilních zkumavek a inkubován 5 minut při 20 °C. Po inkubaci bylo do roztoku přidáno 200 µl chloroformu a roztok byl pečlivě promíchán 15 sekundovým třepáním. Následovala inkubace 10 minut při 20 °C a ihned poté centrifugace při 12 000×g, 15 minut a 4 °C. Po centrifugaci byla odebrána vrchní, vodná fáze, na precipitaci RNA, do které bylo přidáno 500 µl izopropanolu. Roztok byl ponechán v klidu 10 minut při 25 °C, aby došlo k vysrážení RNA. Poté následovala centrifugace při 12 000×g, 8 minut a 25 °C. Supernatant byl odebrán a vzniklá sraženina byla promyta 1 ml 75% ethanolu za použití vortexu a následně roztok centrifugován při 7 500×g, 5 minut a 25 °C. Supernatant byl opět odebrán a sraženina byla ponechána na vzduchu, aby mírně vyschla, ne však zcela (hrozí pak snížení rozpustnosti RNA). Po vyschnutí bylo přidáno 50 µl superčisté sterilní vody bez RNas a tento roztok byl inkubován 15 minut při 60 °C. Neprodleně poté byl roztok RNA použit na cDNA syntézu.

4.1.2. Syntéza First-strand cDNA

Syntéza cDNA z RNA využívá faktu, že mRNA obsahuje na svém konci polyadeninové sekvence, které mohou být využity na přisedání vhodných komplementárních primerů, v tomto případě deoxypolythymidinových. Za použití Superscript III Reverzní transkriptázy se pak mRNA přepíše do, k této RNA komplementární, DNA molekuly, která se následně použije pro PCR jako templát.

Tabulka 4-1: Dvoukrokové složení reakční směsi pro first-strand cDNA syntézu.

	Složka směsi	Objem
Krok 1	oligo-(dT) ₂₀ 50 μM	1 μl
	dNTP 10 mM	1 μl
	Izolovaná RNA	5 μl
	ddH ₂ O (RNase-free)	6 μl
<i>Inkubace 5 min. 65 °C a 1 min. na ledu</i>		
Krok 2	5× First-strand buffer	4 μl
	DTT 100 mM	1 μl
	Superscript III RT (200 u/μl)	1 μl

Složení reakční směsi je uvedeno v *tabulce 4-1*. V prvním kroku byl připraven základ reakční směsi obsahující izolovanou RNA, deoxyribonukleotidy (dNTP) a oligodeoxythymidinové primery (oligo-(dT)₂₀), kterým bylo umožněno se komplementárně navázat na polyadenylované konce mRNA během inkubace. Podmínky této inkubace zahrnovaly zahřátí směsi na teplotu 65 °C po dobu 5 minut a následné přenesení směsi na 1 minutu na led. V druhém kroku byla do směsi přidána nezbytná činidla (First-strand pufr, DTT), nezbytná pro provedení reakce za pomoci Superscript III Reverzní transkriptázy. Takto vzniklá směs byla inkubována 40 minut při 50 °C a poté byla celá reakce zastavena zahřátím na 70 °C po dobu 15 minut. Vzniklá cDNA byla ihned použita pro PCR.

4.1.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR byla použita pro zmnožení sekvencí kódujících požadované proteiny, přičemž byla zároveň zavedena restriční místa pro enzymy *HindIII* a *NdeI*, pomocí kterých byla posléze sekvence zaklonována do produkčního vektoru. Jelikož sekvence obou izotypů proteinu mNKR-P1C jsou v rozsahu použitých primerů stejné, byly tyto primery použity pro zmnožení sekvencí obou izotypů.

mNKR-P1A*NdeI*Forward primer: 5' - GC **CAT ATG** TCA ATA GAA AAA TGC TAT GTG - 3'Reverse primer: 5' - GCA **AGC TTA** TCA GTG TCC ATA ACC CAC ATA GTT GCT - 3'*HindIII***mNKR-P1C***NdeI*Forward primer: 5' - CG **CAT ATG** TCA AGA GAA AAA TGC TGT GTG - 3'Reverse primer: 5' - GCA **AGC TTA** TCA GGA GTC ATT ACT CGG GGT - 3'*HindIII*

Obrázek 4-1: Primery použité při PCR reakci. V sekvencích jsou barevně vyznačena místa štěpení restričními endonukleázami *HindIII* a *NdeI*.

Pro reakci byly použity primery, jež jsou uvedeny na *obrázku 4-1*. Složení reakční směsi je popsáno v *tabulce 4-2* a termální profil pak v *tabulce 4-3*.

Tabulka 4-2: Složení PCR reakční směsi.

Složka směsi	Objem
10× PCR buffer, bez MgCl ₂	5 µl
10 mM dNTP	1 µl
50 mM MgCl ₂	1,5 µl
FW primer	1 µl
RV primer	1 µl
cDNA	1 µl
ddH ₂ O (RNase-free)	39 µl
Platinum Taq DNA polymerase	0,2 µl

Tabulka 4-3: Termální profil PCR reakce.

Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	94 °C	2 min	1
2	94 °C	30 s	30
	50 °C	30 s	
	72 °C	1 min	
3	72 °C	4 min	1
4	4 °C	∞	1

4.1.4. Zaklonování sekvence kódující protein do vektoru

Výrobě produkčního vektoru předcházelo zaklonování sekvence konstruktu do vektoru klonovacího, ve kterém byla sekvence namnožena *in vivo*. Jako klonovací vektor byl použit pCR2.1-TOPO od firmy *Invitrogen*, který byl komerčně dodán v kitu od téhož výrobce. Po namnožení byla vyštěpena a přenesena do produkčního vektoru. Pro přenesení insertu do produkčního vektoru byly použity vložené sekvence pro restriční endonukleasy *HindIII* a *NdeI*.

V prvním kroku byl linearizován produkční vektor pET-30a-(+) a vyštěpen insert z klonovacího vektoru (TOPO), obojí restričním štěpením endonukleázami *HindIII* a *NdeI*; složení reakčních směsí je uvedeno v *tabulce 4-4* na straně 33. Takto připravené vzorky byly umístěny do termostatu na 3 hodiny do 37 °C. Po uplynutí této doby byla provedena agarosová elektroforéza na 1,25% gelu (odstavec 4.5.2). Z gelu byly

segmenty o příslušné délce izolovány pomocí kitu „Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit“ od firmy Geneaid. Izolované fragmenty byly následně použity do ligační směsi v poměru alespoň 1:2 (linearizovaný vektor ku insertu) za použití T4 DNA ligasy; přičemž reakce byla inkubována přes noc při 16 °C a její složení je uvedeno v *tabulce 4-5*. Ligační směs byla poté použita k transformaci kompetentních buněk (odstavec 4.2.1).

Tabulka 4-4: Složení reakční směsi pro linearizování pET-30a-(+) vektoru a vyštěpení sekvence proteinu z TOPO vektoru.

Složka směsi	Linearizace vektoru	Vyštěpení insertu
pET-30a-(+) (1 µg/µl)	10 µl	–
TOPO vektor s insertem (1 µg/µl)	–	20 µl
<i>NdeI</i> (20 000 U/ml)	0,5 µl	0,5 µl
<i>HindIII</i> (20 000 U/ml)	0,5 µl	0,5 µl
NEBuffer 2 (10×)	1,1 µl	2,1 µl

Tabulka 4-5: Složení ligační směsi pro ligování insertu do produkčního vektoru pET-30a-(+).

Složka směsi	Objem
Linearizovaný vektor	5 µl
Insert	11 µl
ATP (20 mM)	0,3 µl
Buffer T4 DNA Ligase	2 µl
T4 DNA Ligase	3,5 µl

4.2. REKOMBINANTNÍ EXPRESE PROTEINŮ

4.2.1. Transformace kompetentních buněk

Buňky jsou do kompetentního stavu uvedeny zpravidla dvojmocnými ionty, které membránu permeabilizují a následně jsou skladovány v čistém LB-médiu při –80°C. Používá se například chlorid vápenatý (tedy Ca²⁺). Plazmidová DNA je do buněk vpravena metodou tepelného šoku.

Suspenze kompetentních buněk byla ponechána asi 30 minut na ledu, aby postupně roztála. K suspenzi o objemu 200 µl bylo po rozmrazení přidáno 1 – 10 ng plazmidové DNA a takto vzniklá směs byla inkubována 30 minut na ledu. Následoval tepelný šok, který byl proveden přenesením buněk na 50 sekund do 42 °C a bezprostředně poté na 1 minutu na led. Poté bylo do této suspenze přidáno 800 µl čistého LB-média a směs byla ponechána 1 hodinu v termostatu při 37 °C. Následně byla směs centrifugována při

3 000×g. Po centrifugaci bylo odebráno 800 µl čistého supernatantu a v jeho zbytku byla peleta resuspendována. Takto vzniklá suspenze byla nanesena a rozetřena na Petriho misku s LB-agarem a příslušnými antibiotiky.

4.2.2. Selekce produkčního klonu

Metoda slouží k výběru klonu produkujícího požadovaný protein.

Zkumavka s 2 ml LB-média a antibiotiky byla inokulována 100 µl testované noční kultury narostlé z jedné kolonie na Petriho misce. Vzorek byl následně inkubován v termostatu při teplotě 37 °C a rychlosti třepání 220 ot./min, až do dosažení $OD_{550} = 0,7$ ($\lambda = 550$ nm). V dalším kroku byl 1 ml kultury přenesen do další zkumavky, kde byla tato kultura indukována 0,1 mM roztokem IPTG a umístěna spolu s původní zpět do stejných podmínek na 3 hodiny. Po uplynutí této doby byly suspenze centrifugovány při 3 000×g 15 minut a 4 °C a pelety byly analyzovány redukční SDS-PAGE (kapitola 4.5.1).

4.2.3. Optimalizace produkce proteinů

Optimalizace produkce byla provedena za účelem zjištění nejvhodnějších podmínek, za kterých lze vyprodukovat co největší množství proteinu. Při optimalizaci byly zkoušeny variace tří faktorů: teploty, délky produkce a koncentrace induktoru (IPTG).

Koncentrace induktoru. Šest zkumavek obsahujících LB-médium s antibiotiky bylo inokulováno 10 µl produkční kultury. Zkumavky byly umístěny do třepačky při 37°C a 220 ot./min do dosažení optické density $OD_{550} = 0,7$. Potom byla ve zkumavkách indukována produkce proteinů rozdílnou koncentrací induktoru, a to 0,01 mM; 0,1 mM; 0,3 mM; 0,5 mM; 1 mM a 5 mM IPTG. Zkumavky byly za stejných podmínek inkubovány další 2 hodiny. Poté byly vzorky stočeny při 3 000×g 5 minut, 4 °C a analyzovány metodou redukující SDS-PAGE.

Teplota. Do dvou zkumavek bylo odměřeno 1 ml LB-média s antibiotiky a médium bylo inokulováno 10 µl produkční kultury. Zkumavky byly umístěny do třepačky při 37 °C a 220 ot./min do dosažení optické density $OD_{550} = 0,7$; kdy bylo přidáno IPTG na finální koncentraci 1 mM. Poté byly zkumavky umístěny do 30°C a 37°C na 2 hodiny. Analýza vzorku (pelety) proběhla po centrifugaci 3 000×g 5 minut a 4 °C metodou redukující SDS-PAGE.

Délka produkce. Bylo připraveno 9 zkumavek s 1 ml LB-média a antibiotiky. Každá byla inokulována 10 µl produkční kultury a umístěna do třepačky při 37 °C a 220 ot./min. do dosažení optické density $OD_{550} = 0,7$; kdy bylo přidáno IPTG na finální

koncentraci 1 mM. V časech 30 minut, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 a 24 hodin byla vždy kultura z jedné zkumavky odebrána k analýze, ostatní byly ponechány až do dalšího odběru. Odebrané kultury byly centrifugovány $3\,000\times g$ 5 minut, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a buněčná peleta byla zmrazena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýzy, která byla provedena metodou redukující SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu.

4.2.4. Určení místa exprese proteinu

Určení místa exprese je důležité ověření předpokladu, že protein se skutečně produkuje do inkluzních tělísek, která jsou z bakterií následně izolována.

Během produkce (kapitola 4.2.5) byly odebrány tři vzorky – 1 ml kultury těsně před indukcí exprese (před přidáním IPTG), 1 ml kultury těsně před ukončením produkce (tzn. 3 – 4 hodiny po indukci) a třetí bylo odebráno v objemu 100 μl čisté médium po centrifugaci produkční kultury.

Během izolace inkluzních tělísek (kapitola 4.2.6) byly odebírány vzorky v objemu 100 μl vždy po dokončení izolace a centrifugaci v určitém kroku – sacharózový pufr, pufr s detergentem a promývací pufr. Nakonec bylo odebráno cca 10 μl inkluzních tělísek.

Všechny vzorky byly před započítáním analýzy skladovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po rozmrazení analyzovány redukční SDS-PAGE (viz odstavec 4.5.1).

4.2.5. Velkoobjemová produkce proteinů

Produkce byla provedena zpravidla v dvoulitrové erlenmayerově baňce s 1 litrem LB-média, které bylo inokulováno 500 – 1000 μl stacionární produkční kultury a inkubováno při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, třepání 220 ot./min. do dosažení OD_{550} rovné 0,7. Poté byla exprese proteinu indukována přidáním IPTG na konečnou koncentraci 0,1 mM a kultura byla ponechána při stejných podmínkách jako výše další 3 – 4 hodiny. Po uplynutí této doby byla kultura centrifugována při $6\,000\times g$, 15 minut a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; supernatant byl odebrán a sediment zmrazen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do započítání izolace inkluzních tělísek.

4.2.6. Izolace inkluzních tělísek

Sediment produkční kultury z 1 litru média byl sonikací resuspendován v 20 ml sacharózového lyzačního pufru a ihned byly přidány inhibitory proteáz leupeptin (na konečnou koncentraci 1 μM) a PMSF (na konečnou koncentraci 1 mM). Buněčná suspenze byla poté 4 \times zmrazena v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a rozmazena ve $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ na vodní lázni za občasných sonikací. Následně bylo do suspenze přidáno 400 μl 1 M roztoku MgCl_2 , 3 μl

DNasy I (zás. roztok 100 U/ μ l), 5 μ l RNasy I (zás. roztok 10 mg/ml) a směs byla ponechána 30 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Po skončení inkubace byla směs vždy 5× střídavě 30 sekund sonikována a na 30 sekund uložena do ledové tříště. Nakonec byla směs centrifugována při 8 000×*g*, 15 minut a 4 °C.

Po centrifugaci byl supernatant odebrán a sediment resuspendována sonikací ve 20 ml pufru s detergentem a inhibitory proteáz jako v předchozím odstavci (leupeptin a PMSF). Suspenze byla poté centrifugována při 8 000×*g*, 15 minut a 4 °C.

Jako v předchozím případě, byl supernatant po centrifugaci odebrán a sediment resuspendována v 10 ml promývacího pufru s inhibitory proteáz sonikací a opět centrifugována jako v předchozím případě.

Po odebrání supernatantu byla sediment, obsahující převážně agregovanou formu rekombinantního proteinu, uchovávána v –80°C.

4.2.7. Rozpuštění inkluzních tělísek

Výsledná sediment z odstavce 4.2.6 byla pomocí vortexu a pipety resuspendována ve 4 ml guanidinového pufru s inhibitorem proteáz leupeptinem na konečnou koncentraci 1 μ M. Zakalený roztok byl inkubován 1 hodinu na vodní lázni při 40 °C. Proces inkubace byl zakončen centrifugací v ultracentrifuze při 185 000×*g*, 30 minut a 20 °C. Supernatant byl ihned použit pro renaturaci proteinu, popsanou v odstavci 4.3.

4.3. RENATURACE PROTEINŮ

4.3.1. Optimalizace renaturace proteinů

Pro optimalizaci renaturace byly navrženy renaturační pufrы, jejichž složení je uvedeno v *tabulce 4-6* na straně 37 a byly použity při optimalizaci všech tří proteinů.

Pufrы se mezi sebou liší různou molární koncentrací L-argininu, poměrem cystaminu a cysteaminu a pH. Důvod, proč jsou v pufrách uvedeny odlišné poměry cystaminu a cysteaminu vůči jejich uvedeným koncentracím je ten, že roztok denaturovaného proteinu, který je do nich přikapáván je mj. 100 mM roztokem DTT z guanidinového pufru, ve kterém byly rozpuštěny inkluzní tělíska. Vlivem DTT se pak redukuje cystamin na cysteamin a dosáhne se tak výsledného poměru, který je také uveden v *tabulce 4-6* na straně 37.

Připravené pufrы byly umístěny do chladové místnosti a bylo do nich přidáno PMSF na konečnou koncentraci 1 mM. Byly připraveny v takovém objemu, aby na 1 ml roztoku

denaturovaného proteinu byl renaturační roztok o objemu 100 ml. Do takto připravených roztoků byl následně za stálého míchání přikapáván roztok denaturovaného proteinu rychlostí asi 1 kapka za sekundu. Po přikapání veškerého proteinu byly roztoky ponechány míchat další hodinu ve stejných podmínkách.

Následně byly roztoky přeneseny do dialyzačního střeva a v případě roztoků 1, 2 a 4 dialyzovány proti 6 litrům dialyzačního pufru o pH 8,5 a roztok 3 proti 2 litrům téhož pufru o pH 9,0. Dialyzační pufrы byly po 6 hodinách vyměněny a dialýza pokračovala dalších 10 hodin.

Nejvhodnější renaturační podmínky byly poté vyhodnoceny porovnáváním ploch píků z chromatografie na koloně Superdex 75 HR 10/300.

Tabulka 4-6: Složení renaturačních pufrů.

Složka	1	2	3	4
Tris-HCl		50 mM		
CaCl ₂		100 mM		
NaN ₃		1 mM		
L-arginin	1 M	1 M	1 M	0,4 M
cysteamin	9 mM	9 mM	6 mM	9 mM
cystamin	3 mM	3 mM	3 mM	3 mM
↘ poměr	10:2	10:2	5:2	10:2
pH	8,5	9,0	8,5	8,5

4.3.2. Optimalizace renaturace mNKR-P1C

Z důvodů, jež jsou uvedeny ve výsledcích, byla renaturace rekombinantního proteinu mNKR-P1C izotypu 1 optimalizována v jiných renaturačních roztocích, jejichž složení je uvedeno v *tabulkách 4-7 a 4-8* na straně 38. Celkový postup práce byl jinak zcela shodný s postupem uvedeným v kapitole (4.3.1). Jedinou výjimkou jsou renaturační roztoky H a H*, do kterých byl redoxní systém přidán až po předchozí renaturaci proteinu a to v objemu 1 ml, pomalým přikapáním za stálého míchání. Přikapávaný roztok měl takovou koncentraci, aby v konečném objemu renaturačního pufru byla koncentrace cysteaminu 9 mM a cystaminu 3 mM.

Rovněž byly vyzkoušeny renaturační podmínky založené na publikaci *C. Weie* [77]. Inkluzní tělíška byla solubilizována v 8 M močovinovém pufru (pufr „A“) s leupeptinem (konečná koncentrace 1 μM) 2 hodiny při 30 °C. Potom byl roztok ultracentrifugován při 185 000×g 30 minut a v supernatantu byla změřena koncentrace proteinů podle Bradfordové. Supernatant byl pak naředěn pufrém A na koncentraci 2 mg proteinu/ml a potom byl k tomuto roztoku znovu přidán pufr A, tentokrát s přidáním redoxním systémem (9 mM redukovaný glutathion; 3 mM oxidovaný glutathion) v objemu 12,5× větším než je objem naředěného roztoku proteinu. Tento roztok byl inkubován 24 hodin

při 15 °C. Po uplynutí této doby bylo pH roztoku upraveno 1 M HCl na pH 8,0 a ponechán opět při 15 °C 1 hodinu inkubovat. Vzorek byl poté dialyzován jedenkrát proti 8 litrům dialyzačnímu pufru 12 hodin. Následovala chromatografická analýza jako v kapitole 4.4.

Tabulka 4-7: Složení renaturačních pufrů s odlišnými koncentracemi cysteaminu a cystaminu pro optimalizaci renaturace mNKR-P1C izotypu 1.

Složka	A	B	C	D	E
Tris-HCl			50 mM		
CaCl ₂			100 mM		
NaN ₃			1 mM		
L-arginin			1 M		
cysteamin	–	2 mM	4 mM	–	6 mM
cystamin	–	2 mM	2 mM	3 mM	3 mM
↘ poměr	–	3:1	5:1	0:2	7:2
pH	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0

Tabulka 4-8: Složení modifikovaných renaturačních pufrů pro renaturaci mNKR-P1C izotypu 1.

Složení	F	F*	G	G*	H	H*
Ostatní složky	50 mM Tris-HCl; 100 mM CaCl ₂ ; 1 M L-arginin; 1 mM NaN ₃ ; pH 9,0					
Redoxní systém	cysteamin/ cystamin	cysteamin/ cystamin	glutathion	glutathion	cysteamin/ cystamin	cysteamin/ cystamin
Koncentrace redox. partnerů	9 mM redukováná forma, 3 mM oxidovaná forma					
10% glycerol	–	ano	–	ano	–	ano
Poznámka	–	–	–	–	redox. systém přidán až po předchozí renaturaci	

4.3.3. Velkoobjemová renaturace

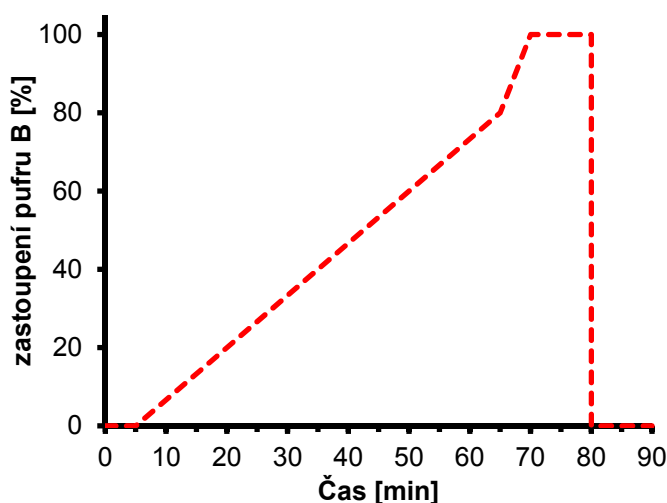
Renaturace velkého množství proteinu probíhala stejně tak, jak je popsáno v odstavci 4.3.1 (pro mNKR-P1A a mNKR-P1C izotyp 2) a odstavci 4.3.2 (pro mNKR-P1C izotyp 1) s tím rozdílem, že protein byl renaturován ve 400 ml renaturačního pufru, jehož složení bylo již experimentálně optimalizováno. Tento objem roztoku byl poté dialyzován dvakrát proti 8 litrům dialyzačního pufru.

4.4. CHROMATOGRAFICKÉ METODY

Tyto metody byly použity k získání čistého proteinu z renaturační směsi. Pro separace byl použit HPLC systém BioSys 510 a detekce při $\lambda = 280$ nm.

4.4.1. Separace na ionexu

Při iontové výměnné, či ionexové chromatografii dochází k separaci složek směsi na základě náboje. V proteinu interagují nabitě aminokyseliny s částicemi ionexu nesoucími rovněž nabitě skupiny. Složky se nekovalentně naváží na nosič a k jejich postupné eluci pak dochází na základě vzrůstající iontové síly – tedy kompetici iontů pufru se složkami separované směsi. Jedná se tak o gradientovou separaci, kdy je směs nanášena v pufru o nízké iontové síle a eluována puftrem o vysoké iontové síle, respektive postupně a spojitě vzrůstající iontové síle.



Obrázek 4-2: Gradient ionexové chromatografie. Graficky znázorněný gradient pro ionexovou chromatografii.

Vzorek proteinu o nízkém obsahu solí, ultrafiltrací zahuštěný na objem cca 40 ml byl nanesen na kolonu Q-Sepharosy (rozměry 2 × 13,5 cm). Tato kolona byla předem ekvilibrována puftrem A. Poté byla zahájena separace lineárním gradientem pufru B při průtoku 3 ml/min. Gradient je znázorněn na obrázku 4-2.

Frakce byly jímány do zkumavek a pro následující gelovou filtraci byly zahuštěny v koncentrátorech (*Millipore*).

4.4.2. Gelová filtrace

Jedná se o metodu chromatografie, při které se dělí složky směsi na základě rozdílné velikosti a tvaru molekul. Kolonou rychleji prochází větší molekuly, které nemohou pronikat do pórů částic, zatímco menší do pórů pronikají, tím se zpomaluje jejich průchod kolonou a elují se pomaleji.

Vzorek proteinu po předchozí separaci na Q-Sepharose a zahuštěný na objem cca 500 μ l, byl nanesen na kolonu Superdex 75 HR 10/300 (rozměry 1 × 30 cm) předem

promytou elučním pufrům pro gelovou filtraci. Následovala separace při průtoku 0,4 ml/min. Frakce byly jímány do zkumavek a čistota preparátu byla ověřena pomocí metody SDS-PAGE.

4.5. ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

4.5.1. Diskontinuální SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Obecně tato elektromigrační metoda slouží k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti v elektrickém poli, jež je daná hlavně délkou peptidového řetězce, formě a stupni sbalení proteinu a dalších modifikacích. Separace probíhá ve vhodném gelu o určité hustotě, která rozhoduje o efektivitě separace pro dané velikosti molekul. Přídavkem dodecylsírany sodného (SDS) se překryje vlastní náboj proteinových molekul a ty pak získají náboj úměrný velikosti molekuly. Proteiny se tedy pak separují na základě velikosti.

Diskontinuální metoda využívá navíc dvou typů gelů (polyakrylamidových) o různých pH a hustotách, kdy v řidším – zaostřovacím – dochází k rychlejší migraci, díky které se vzorek nakumuluje na rozhraní gelů a to zajistí větší přesnost dělení a rozlišení v gelu separačním – hustším.

Do vzorkových jamek gelu, který byl připraven podle *tabulky 4-9* byly naneseny vzorky v objemu 10 μ l připravené postupem uvedeným v odstavcích níže. Gel byl poté vložen do pufru a bylo na něj přivedeno napětí 200 V. Po skončení elektroforézy byl gel barven 15 minut barvicím roztokem s Coomassie Brilliant Blue R-250 a poté odbarven mnohočetným promytím odbarvovacím roztokem.

Tabulka 4-9: Složení gelů pro elektroforetické dělení proteinů.

Složka směsi	Objem [ml]	
	15% separační gel	5% zaostřovací gel
H ₂ O	1,1	0,68
30% akrylamid	2,5	0,17
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3	–
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	–	0,13
10% SDS	0,05	0,01
10% APS	0,05	0,01
TEMED	0,002	0,001

Zpracování vzorků

Tekuté vzorky byly v objemu 10 μl přidány do zkumavky, kde k nim bylo přidáno 10 μl 2 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE, centrifugovány 10 000 $\times g$ 5 minut, laboratorní teploty a naneseny na gel.

K *pevným vzorkům* (pelety) o objemu cca 10 μl bylo přidáno 130 μl 1 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE, centrifugovány 10 000 $\times g$ 5 minut, laboratorní teploty a naneseny na gel.

Redukující verze SDS-PAGE byla provedena tak, že vzorkové pufrы obsahovaly DTT (100 mM) a byly před centrifugací a po smíšení se vzorky 5 minut povařeny na vodní lázni.

4.5.2. DNA elektroforéza na agarosovém gelu

Molekula DNA díky zápornému náboji fosfátových skupin putuje k anodě a je proto možné ji elektroforeticky dělit na gelu. Jako gel je obvykle používán agarosový, přičemž jeho koncentrace se volí na základě délky analyzovaných fragmentů. Jelikož délka molekuly DNA je přímo úměrná počtu nábojů na fosfátech, probíhá separace na základě délky molekuly. Pro splnění tohoto předpokladu je však nutné dělit lineární molekuly DNA a vyvarovat se cyklickým (například plasmidy), které zauímají strukturní konformace a projevují se na gelu jako odlišitelné frakce, i když se jedná o jednu a tutéž molekulu. K detekci fragmentů DNA se používá ethidium bromid, který je součástí gelu a během migrace molekul gelem se interkaluje do struktury DNA. Detekce pak probíhá pod UV osvětlením, kdy ethidium bromid emituje viditelné světlo.

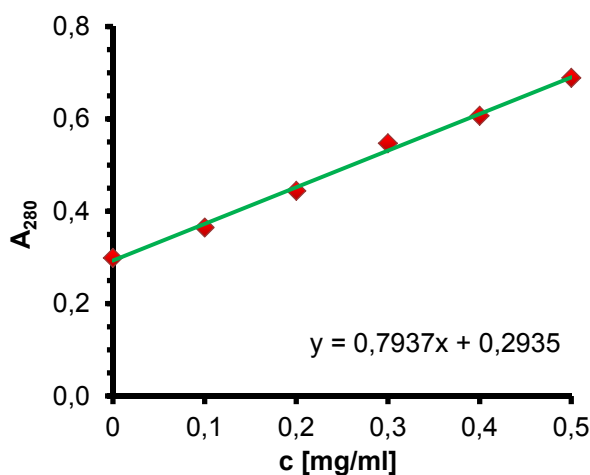
Byl připraven 1,25% agarosový gel povařením 0,5 g agarosy ve 40 ml TAE pufru. Po zchladnutí roztoku na cca 50 $^{\circ}\text{C}$ byly do gelu přidány 2 μl nasyceného roztoku ethidium bromidu a gel byl přenesen do nádoby na elektroforetický gel, kde do něj byl vsazen hřeben na zformování vzorkových jamek. Po zchladnutí a ztuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické aparatury, překryt vychlazeným TAE pufrem a byly naneseny vzorky. Separace probíhala při napětí 90 V a následná detekce pod UV lampou.

Příprava vzorků. Na každých 10 μl vzorku byly přidány 2 μl 6 \times koncentrovaného nanášecího pufru (6 \times loading buffer; komerčně dodávaný) a smíchány. Vzorky byly poté naneseny na gel.

4.6. STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ PODLE BRADFORDOVÉ

Stanovení proteinů touto metodou je založeno na posunu absorpčního maxima barviva ($\lambda = 465 \text{ nm}$) Coomassie Brilliant Blue G-250, ke kterému dochází po adsorpci barviva na molekulu proteinu. To po adsorpci získá výrazně modrou barvu, zatímco roztok nevázaného barviva je hnědý. Koncentraci tak lze stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm , přičemž míra absorbance při této vlnové délce je přímo úměrná koncentraci proteinu ve vzorku. Pro stanovení je rovněž vždy potřeba připravit řadu kalibračních roztoků, z jejichž absorbance (vynesené do grafu a proložené lineární regresí, příklad grafu je na *obrázku 4-3*), lze vypočítat koncentraci proteinu v paralelně změřeném vzorku.

Do 96 jamkové destičky byla přidána v objemu $5 \mu\text{l}$ a duplikátech sada šesti kalibračních roztoků BSA o koncentracích 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg/ml. Stejně tak



Obrázek 4-3: Příklad grafu s kalibrační křivkou pro stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové. V pravé dolní části grafu je zobrazena rovnice regrese křivky, pomocí které lze vypočítat koncentraci proteinu ve vzorku z jeho změřené absorbance.

bylo do destičky přidáno duplicitně $5 \mu\text{l}$ roztoku vzorku proteinu. Do všech jamek s roztoky bylo nakonec přidáno $195 \mu\text{l}$ činidla podle Bradfordové. Poté byly absorbance roztoků změřeny v přístroji Sapphire Microplate Reader při vlnové délce 595 nm . Hodnoty absorbancí standardů byly zaneseny do grafu, proloženy lineární regresní přímkou a z rovnice regrese této přímky a vlastní absorbance vzorku, byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorku.

4.7. METODY HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie je technika umožňující přesné stanovení molekulové hmotnosti. Soudobé hmotnostní spektrometry sestávají vždy ze čtyř základních částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a řídicího počítače zpracovávajícího data. Částice (atom, molekula) ionizovaná v iontovém zdroji je usměrněna skrze hmotnostní analyzátor (umožňující ionty oddělit na základě jejich hmotnosti) na detektor v závislosti hlavně na svém nábojovém stavu a hmotnosti

pomocí elektromagnetického pole, které ji při průchodu buď zpomalí, nebo zrychlí. Výsledná spektra tak udávají intenzitu proudu částic dopadajících na detektor v závislosti na poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z).

Aby bylo možné stanovit touto metodou velké organické molekuly (proteiny) jsou zapotřebí měkké metody ionizace, protože tvrdé mohou molekulu rozštěpit. Mezi tyto měkké ionizační techniky patří například ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace/desorpce za přítomnosti matrice (MALDI).

K identifikacím proteinů se používá například technika peptidového hmotnostního mapování, také nazývaná jako peptidový „otisk prstu“ (anglicky peptide mass fingerprint). Protein je v takovém případě nejprve štěpen specifickými proteázami a výsledné fragmenty jsou analyzovány na hmotnostním spektrometru. Výsledkem štěpení specifickou proteázou je sada unikátních peptidů charakterizujících daný protein – fingerprint.

Před konečnou analýzou metodou LC-MS lze ověřit získané peptidy pomocí metody MALDI-MS. Peptidy se v takovém případě nanesou na speciální terčík spolu s matricí, jíž je obvykle kyselina 4-hydroxy- α -kyanoskořicová a nechá se vykrystalizovat. Peptidy s matricí jsou pak laserem odpařovány a analyzovány na hmotnostním spektrometru. Metoda je vhodná pro orientační stanovení, protože na rozdíl od LC-MS se měří neseparované peptidy ve směsi.

4.7.1. Odsolení vzorku

Jelikož při analýze hmotnostní spektrometrií je nežádoucí přítomnost solí (iontů) a detergentů, je potřeba vzorek přečistit. K tomuto účelu se používá chromatografická mikro kolona MicroTrap s reverzní fází, jíž je polymerní nosič. Na stacionární fázi této kolony se naváže protein, který s touto fází interaguje, promytím se zbaví zbytků pufrů a solí a následně se eluuje organickým rozpouštědlem (acetonitrilem). Takto získaný vzorek lze pak použít pro analýzu.

Tabulka 4-10: Postup odsolení vzorku pomocí kolony MicroTrap.

Krok	Roztok	Objem	Popis
1	10% FA v AcN	250 μ l	silné promytí kolony
2	90% AcN 0,4% FA	500 μ l	promytí kolony
3	0,4% FA	250 μ l	ekvilibrace kolony
4	Vzorek proteinu	150 μ l	nanesení vzorku
5	0,4% FA	500 μ l	promytí (odsolení) vzorku
6	50% AcN 0,4% FA	50 μ l	eluze vzorku z kolony

Postup odsolení vzorku touto metodou je shrnut v *tabulce 4-10* na straně 43. Pro každý následně odsolovaný vzorek je potřeba zopakovat všechny kroky v tabulce uvedené. V případě vzorku byl z jeho zásobního roztoku o koncentraci alespoň 1 mg/ml odebrán objem obsahující 10 µg proteinu. Toto množství bylo zředěno na celkový objem 150 µl roztokem 0,4% kyseliny mravenčí. Takto připravený vzorek byl nanesen na kolonu, odsolen a použit pro analýzu na hmotnostním spektrometru.

4.7.2. Stanovení monoizotopické hmotnosti proteinů

Monoizotopická hmotnost proteinu byla analyzována metodou přímého vstupu. Použitý spektrometr využívající Fourierovu transformaci ve spojení s iontově cyklotronovou rezonancí (FT-ICR) umožňuje určit jejich hmotnost proteinu s velkou přesností. Proteinové molekuly jsou ionizovány elektrosprejem a průchodem přes hexapól a kvadrupól usměrněny do ICR cely. ICR cely sestává ze statického magnetického a oscilujícího elektrického (excitačního) pole, které nutí ionty rotovat po určitých orbitách. Ty pak způsobují iontovou cyklotronovou rezonanci, která je Fourierovou transformací převedena na hmotnostní spektrum. Monoizotopickou hmotnost bylo možné odečíst díky velkému rozlišení získaných hmotnostních spekter. Z těch byla odečtena algoritmem SNAP, založeném na funkci *averagine*^[78].

Vzorek proteinu odsoleného podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.1 byl nastříknut do hmotnostního spektrometru a ke stanovení celkové hmotnosti proteinů bylo využito metody ESI-FT-ICR.

4.7.3. Stanovení disulfidických můstků

Úkolem této metody je pomocí vhodné kombinace proteáz a následného měření LC-MS stanovit zda a jak se párují cysteiny v molekule proteinu. Podstatou je zvolit takové proteázy, které štěpí protein na úseky obsahující vždy maximálně jeden cystein. V praxi je však obtížné najít jednu takovou proteázu a proto se volí jejich kombinace.

Jelikož se zároveň jedná o charakterizaci proteinů metodou peptidového hmotnostního mapování, byla u získaných peptidů stanovena hmotnostní spektra metodou MALDI s detekcí metodou FT-ICR.

Vzorky proteinů v množství 20 µg/vzorek byly nanesený na polyakrylamidový gradientový gel (4 – 12 %) a následně byla provedena neredukující SDS elektroforéza v přítomnosti cysteaminu (300 µM ve vzorkovém pufru) při napětí 200 V. Proteiny v gelu byly vizualizovány barvicím roztokem s Coomassie Brilliant Blue R-250. Místa

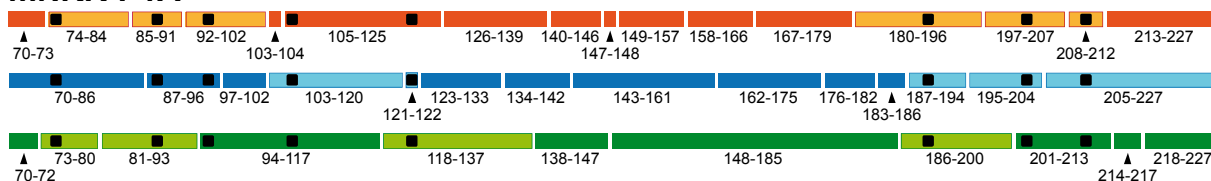
Tabulka 4-11: Přehled použitých proteáz a reakčních směsí. „x“ značí libovolnou aminokyselinu; „*“ značí místo štěpení; štěpná místa jsou zapsána z N-konce k C-konci.

Proteáza	Místa štěpení	Výsledná koncentrace proteázy v reakční směsi
Trypsin	xR*x nebo xK*x	10 ng/μl
Asp-N	xE*x	5 ng/μl
Glu-C	x*Dx	5 ng/μl

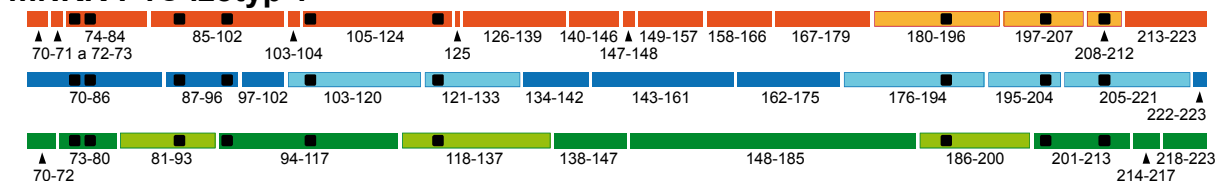
v gelu, jež obsahovala dané proteiny, byla vyřezána, rozkrájena na kostičky a přenesena do čistých zkumavek. Gel byl potom odbarven v 200 μl směsi (1:1) AcN a ethylmorfolinového pufru (pH 8,5) sonikací, přičemž tento proces byl realizován alespoň 3×, aby došlo k důkladnému odbarvení gelu. Následovalo 2× promytí s 10 minutovou sonikací střídavě 200 μl AcN a 200 μl H₂O a nakonec byl gel sonikován ve směsi (1:1) AcN/H₂O. Roztok byl odebrán a gel zcela vysušen vakuovou odparkou. Následně bylo přistoupeno ke štěpení proteázami, jak je uvedeno v *tabulce 4-11*. Roztoky těchto proteáz byly přidány k vysušeným gelům v takovém objemu, aby přesně překryly kusy gelu. Reakce byly inkubovány 12 hodin ve vodní lázni při 37°C za přítomnosti 300 μM cysteaminu. Na *obrázku 4-4* jsou schematicky vyobrazeny proteolytické štěpy proteinů vznikající při štěpení těmito proteázami.

Po uplynutí této doby bylo do reakčních směsí přidáno 15 μl roztoku 0,2% TFA v AcN

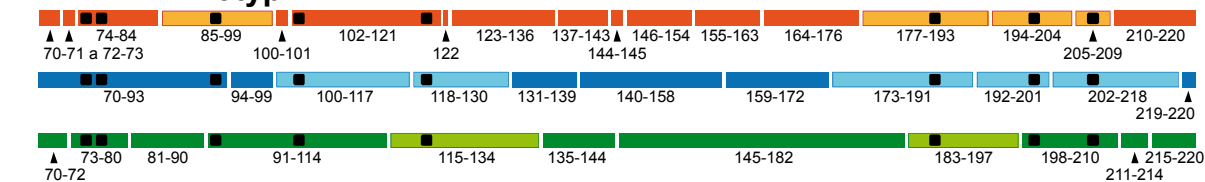
mNKR-P1A



mNKR-P1C izotyp 1



mNKR-P1C izotyp 2



Trypsin Asp-N Glu-C Peptidy obsahující pouze jeden cystein Cystein

Obrázek 4-4: Schematické znázornění štěpení proteinu příslušnými proteázami. Čísla pod jednotlivými úseky udávají délku proteolytického štěpu a vztahují se ke kompletní sekvenci proteinu. Každý úsek, oddělený od druhého bílou čarou představuje jeden štěp.

a zkumavky byly stočeny. Supernatant byl odebrán, následně byla provedena extrakce vzniklých peptidů z gelů a to přidáním 100 μ l 0,2% TFA v H_2O s desetiminutovou sonikací. K tomuto objemu bylo přidáno 100 μ l AcN a směs byla opět 10 minut sonikována. Roztok byl poté odebrán a přenesen do nových zkumavek. Tento postup, počínaje přidáním 100 μ l 0,2% TFA v H_2O byl ještě alespoň 2 \times zopakován. Nastřádaný extrakt byl poté odpařen ve vakuové odparce.

Vysušený sediment na dně zkumavky byl poté rozpuštěn v 10 μ l roztoku 0,4% kyseliny mravenčí v 50% AcN a doplněn na 200 μ l solventem A určeným pro odsolení vzorku. Takto získaný roztok byl odsolen na koloně MicroTrap určené pro peptidy a výsledný odsolený vzorek peptidů byl ověřen MALDI-MS a analyzován metodou LC-MS. Pro separaci peptidů na LC-MS byla použita kolona s reverzní fází Michrom o rozměrech 0,2 x 150 mm na systému μ HPLC Agilent 1200. Výstup z této kolony byl napojen na ESI zdroj v hmotnostním spektrometru.

Získaná hmotnostní spektra a eluční profily z LC-MS byly použity k nalezení příslušných peptidů, spojených disulfidovými můstky, pomocí software *Links*^[79].

4.8. FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

Rekombinantní proteiny byly značeny pomocí kitů od firmy Invitrogen. Značení bylo provedeno zcela v souladu s protokolem až na konečnou separaci. Ta byla provedena gelovou filtrací na koloně Superdex 200 HR 10/30 s detekcí při 280 nm v pufru PBS s 1 mM NaN_3 .

4.8.1. Značení buněk rekombinantními proteiny s fluorescenční značkou

Následující postup značení byl laskavě poskytnut Doc. RNDr. Janem Černým, Ph.D. Tento protokol popisuje značení buněk přisedlých na sklíčko, či dno Petriho misky, nikoli buněk v suspenzi. Uvedené objemy přidávaných roztoků se týkají značení ve standardní 6 jamkové destičce o rozměrech 128 x 85,5 mm s plochou dna jamky 9,6 cm², v níž bylo umístěno vždy jedno sklíčko s přisedlými buněčnými kulturami o rozměrech 2 x 2 cm. Byly připraveny celkem tři typy preparátů: Negativní kontrola (K), značení fixovaných buněk (F) a značení fixovaných permeabilizovaných buněk (F_P).

V prvním kroku byla provedena fixace buněk všech tří typů preparátů. K přisedlým buněčným kulturám, zbavených původního média, byl přidán roztok 4% formaldehydu v PBS v objemu 2 ml na dobu 30 minut. Poté byl roztok odebrán a preparáty byly 3 \times

promyty 2 ml roztoku PBS. Pouze preparáty F_p byly ještě permeabilizovány roztokem 0,5% Tritonu X-100 v PBS po dobu 1 minuty a poté ihned 2× promyty roztokem PBS. Následně byly všechny fixované preparáty ošetřeny proti nescifické vazbě 10minutovou inkubací v 1% BSA v PBS; roztok byl pak odebrán. V dalším kroku bylo přistoupeno ke značení. Preparáty byly převrstveny 50 μ l roztoku fluorescenčně značeného rekombinantního proteinu v 1% PBS o koncentraci proteinu 100 ng/ml a byly ponechány inkubovat 40 minut. Nakonec byly preparáty 3× promyty 2 ml roztoku PBS a přeneseny na sklíčko se 40 μ l směsi Mowiolu a fluorescenčního barviva DAPI (1 μ g/ml). Preparát byl umístěn do chladničky a tmy, aby nedošlo k fotolýze barviv.

4.9. ZAHUŠŤOVÁNÍ PROTEINŮ

4.9.1. Ultrafiltrace

Po dialýze, kdy byl protein naředěn ve velkém objemu, byla použita metoda ultrafiltrace. Vzorek byl zahuštěn na objem cca 30 ml pomocí ultrafiltrační membrány z PLGC celulosy o průměru 76 mm a propustností do 10 kDa. Membrána byla vložena lesklou, aktivní, stranou tak, aby byla tato strana ve styku se zahušťovaným roztokem. Po naplnění soupravy vzorkem zředěného proteinu byl do aparatury přiveden dusík o stálém tlaku 0,5 MPa. Zahušťování probíhalo za laboratorní teploty a mírného míchání.

4.9.2. Centrifugační koncentrátoři

Pomocí centrifugačních koncentrátorů Amicon Ultra s objemem 15 ml byly vzorky proteinu zahušťovány na objem 500 μ l centrifugací v centrifuze s výkyvným rotorem při 2 000×g a laboratorní teplotě.

5. VÝSLEDKY

5.1. ÚVOD K VÝSLEDKŮM

Úvodem k výsledkům je třeba zmínit sekvence jednotlivých exprimovaných proteinů. Tyto údaje byly získány z webové stránky UniProt^[80; 81] a jsou uvedeny níže na obrázku 5-1. Přehled důležitých údajů o proteinech je uveden v *tabulce 5-1* na straně 49. Hmotnost redukováných rekombinantních proteinů byla získána po redukci proteinu redukčním činidlem TCEP o koncentraci 30 mM po dobu 3 – 5 minut a teplotě 65 °C.

Pro lepší přehlednost a stručnost jsou v grafech a obrázcích rekombinantní proteiny mNKR-P1C označovány jako mNKR-P1C1 (v případě mNKR-P1C izotypu 1) a mNKR-P1C2 (pro mNKR-P1C izotyp 2). mNKR-P1A bude i nadále označován stejně.

mNKR-P1A

10	20	30	40	50
MDTARVYFGL	KPPRTPGAWH	ESPPSLPPDA	CRCPRSHRLA	LKLS CAGLIL
60	70	80	90	100
LVVTLIGMSV	LVRVLIQKPS	IEKCYVLIQE	NLNKTTDCSA	KLECPQDWLS
110	120	130	140	150
HRDKCFHVSQ	VSNTWEEGLV	DCDGKGATLM	LIQDQEELRF	LLDSIKEKYN
160	170	180	190	200
SFWIGLRITL	PDMNWKWING	STLNSDVLKI	TGDTENDSCA	AISGDKVTFE
210	220			
SCNSDNRWIC	QKELYHETLS	NYVGYGH		

mNKR-P1C

10	20	30	40	50
MDTASIYLG L	KPPRTLGAWH	ESPPSLPPDA	CRCPRSHRLA	LKLS CAGLIL
60	70	80	90	100
LVLTLIGMSV	LVRVLVQKPS	REKCCVFIQE	NLNKTTDCSV	NLECPQDWLL
110	120	130	140	150
HRDKCFHVSQ	VSNTWEEGQA	DCGRKGATLL	LIQDQEELRF	LLDSIKEKYN
160	170	180	190	200
SFWIGLRFTL	PDMNWKWING	TFNSDVLKI	TGVTENGSCA	SILGDKVTPE
210	220			
SCASDNRWIC	QKELNHETPS	NDS		

Obrázek 5-1: Sekvence proteinů^[80; 81]. **Zeleně** zvýrazněna je intracelulární část, **oranžově** transmembránová, **modře** extracelulární krček a **černě** je zbývající extracelulární část molekuly počínaje C-lektinovou doménou. **Podtržením** jsou zvýrazněny sekvence proteinů, jimiž se zabývá tato diplomová práce. **Oranžově** podbarvené aminokyseliny u sekvence mNKR-P1C (DCS) jsou součástí izotypu 1 tohoto proteinu, zatímco u izotypu 2 chybí.

Tabulka 5-1: Důležité údaje o exprimovaných proteinech. $n \times SS$ znamená disulfidový můstek a $n \times SH$ redukovaný cystein, kde za n je dosazeno číslo vyjadřující jejich počet v molekule.

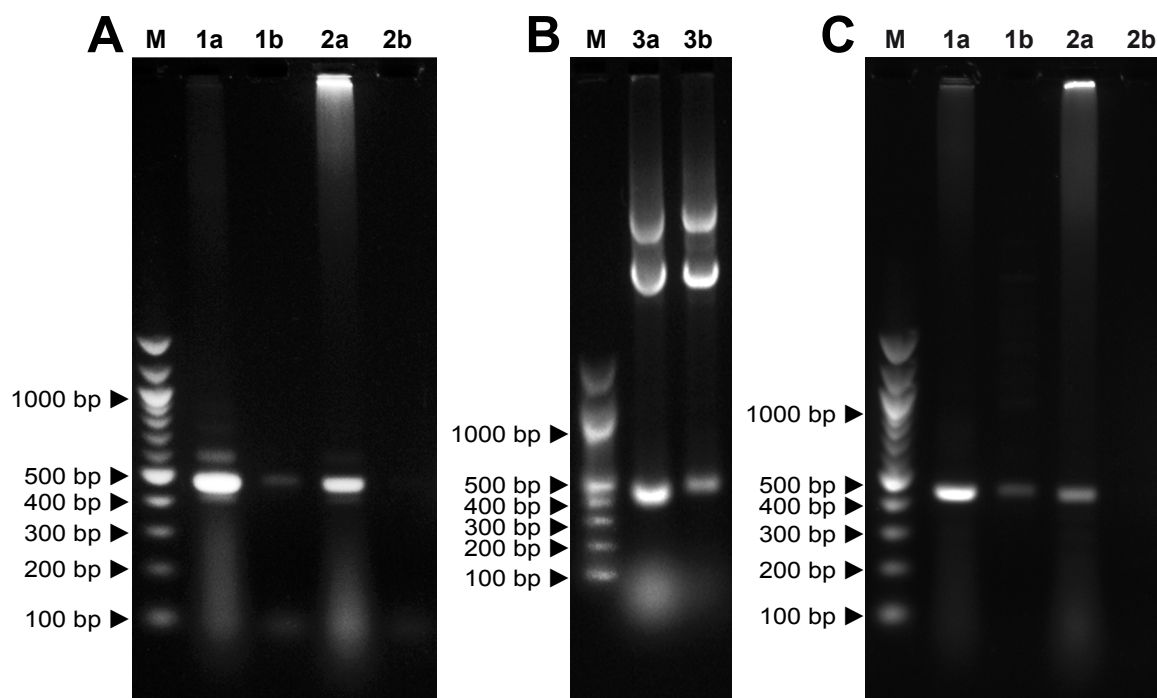
Protein		Teoretická monoizotopická hmotnost [Da]	Izoelektrický bod, teoretický (pI)
mNKR-P1A	redukovaný	18176,6170 (8×SH)	4,76
	oxidovaný	18168,5544 (4×SS)	
mNKR-P1C1	redukovaný	17611,4335 (9×SH)	4,94
	oxidovaný	35204,7261 (4×SS v každé jednotce + 1×SS intermolekulární)	
mNKR-P1C2	redukovaný	17306,3653 (8×SH)	5,05
	oxidovaný	17298,3027 (4×SS)	

5.2. PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ

5.2.1. Kontrola PCR amplifikace

Sekvence proteinů byla amplifikována pomocí PCR reakce tak, jak je uvedeno v kapitole 4.1.3. Pro ověření její správnosti byla výsledná reakční směs podrobena elektroforetické separaci na 1,25% agarosovém gelu.

Na gelech vyobrazených na *obrázku 5-2* je vidět, že amplifikace proběhla úspěšně. Je třeba také zmínit, že reakce byla vždy provedena s jak neředěnou, tak s 50× naředěnou



Obrázek 5-2: Snímky agarosových gelů použitých ke kontrole správné délky amplikonů. *M* označuje marker; číslo 1 slezinu 1; číslo 2 slezinu 2; číslo 3 cDNA poskytnutou O. Vaňkem; malým písmenem „a“ jsou označeny vzorky, kde bylo v PCR reakci užito neředěné cDNA, jako „b“ vzorky, kde bylo užito 50× zředěné cDNA. Gel **A** = mNKR-P1A, **B** = mNKR-P1C izotyp 1, **C** = mNKR-P1C izotyp 2.

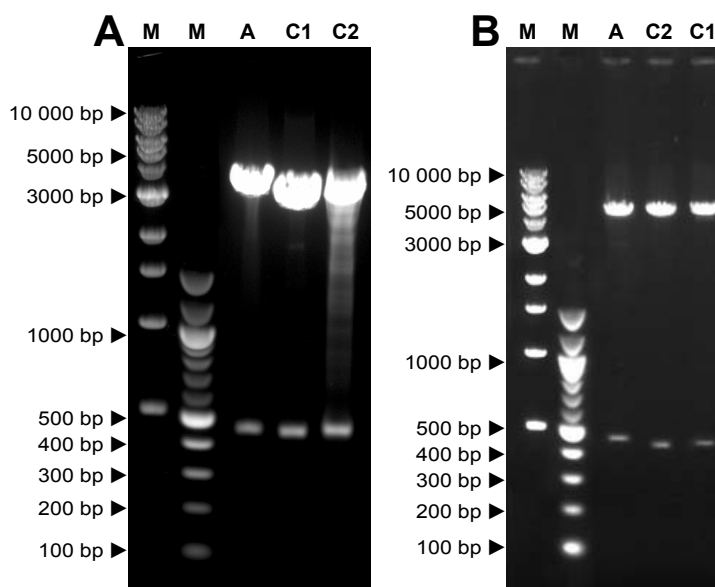
cDNA, protože koncentrovaná může obsahovat inhibitory (z buněčného materiálu), které by ztěžovaly reakci; takové vzorky jsou na *obrázku 5-2* (str. 49) označeny „b“ za příslušným číslem, zatímco vzorky neřaděné písmenem „a“. V případě proteinů mNKR-P1A a mNKR-P1C izotypu 2 byla PCR reakce provedena s pomocí cDNA připravené z mRNA ze dvou různých slezin (cDNA z první sleziny označena číslem 1 a druhé číslem 2), zatímco u proteinu mNKR-P1C izotypu 1 z cDNA poskytnuté Mgr. Ondřejem Vaňkem (číslo 3). Délky fragmentů zhruba odpovídají délce 483 párů u mNKR-P1A, 471 párů bází u mNKR-P1C izotypu 1 a respektive 462 u mNKR-P1C izotypu 2. Důvod přítomnosti velkých fragmentů DNA na gelu mNKR-P1C izotypu 1 není znám a nebyly dále analyzovány.

5.2.2. Restrikční analýza

Před tím, než byly vektory TOPO a pET-30a obsahující sekvence příslušných rekombinantních proteinů podrobeny analýze sekvenací a použity pro další experimenty, byla provedena restrikční analýza. Ta by odhalila případné nesrovnalosti v délce vyštěpených fragmentů, které lze na základě znalosti délek vektoru a vložené sekvence proteinu předpovědět.

Obrázek 5-3 znázorňuje štěpení současně dvěma restrikčními endonukleázami *HindIII* a *NdeI*. Délky

vyštěpených fragmentů přibližně odpovídají 483 párům bází pro mNKR-P1A (dráha A), 471 párům bází pro mNKR-P1C izotyp 1 (dráha C1) a 462 párům bází pro mNKR-P1C izotyp 2 (dráha C2). Velké zóny v horní části gelu odpovídají zbytku TOPO vektoru (~3,6 kb), resp. produkčního vektoru pET-30a (~5,2 kb). Následná analýza vektorů sekvenací potvrdila správnost vložených sekvencí kódujících všechny tři proteiny.



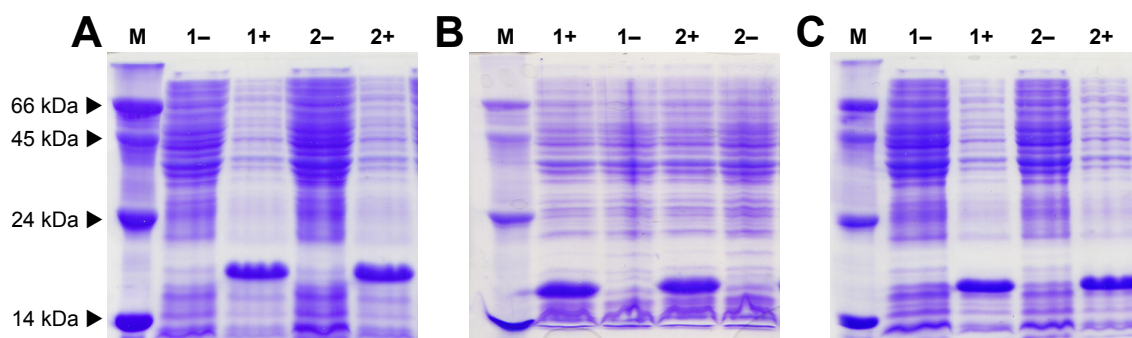
Obrázek 5-3: Restrikční analýza vektorů TOPO a pET-30a(+) se zaklonovanými sekvencemi rekombinantních proteinů. Gel A zobrazuje restrikční analýzu klonovacích vektorů pCR-2.1-TOPO a gel B restrikční analýzu produkčních vektorů pET-30a(+). Dráha A = mNKR-P1A, C2 = mNKR-P1C izotyp 2 a C1 = mNKR-P1C izotyp 1. Štěpení bylo ve všech případech provedeno restrikčními endonukleázami *HindIII* a *NdeI*. Dráhy M obsahují sekvence DNA o známých délkách.

5.3. PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

5.3.1. Selekce produkčních klonů

Tato metoda se používá k analýze bakterií, jež byly transformovány produkčním vektorem (např. pET-30a(+)), protože odhalí, zda bakterie skutečně nesou tento produkční vektor a jsou schopny produkce rekombinantních proteinů. V principu se tak stacionární kultura rozdělí na dvě stejné části nadále inkubované při stejných podmínkách, ale pouze v jedné (označené „+“ na *obrázku 5-4*) je indukována exprese proteinů 1 mM IPTG, zatímco v druhé části nikoli - ta slouží jako kontrola (na *obrázku 5-4* označeny „-“). Stanovení bylo provedeno podle kapitoly 4.2.2. a kultury byly následně analyzovány metodou redukující SDS-PAGE na 15% gelu v redukujícím prostředí.

Jak je vidět na elektroforeogramech na *obrázku 5-4*, všechny testované kultury produkovaly protein - to naznačují intenzivní zóny na gelech v drahách označených „+“, které se však nevyskytují v drahách „-“. Tyto zóny odpovídají velikostem proteinů cca 18 kDa pro mNKR-P1A (*obrázek 5-4A*) a 17 - 18 kDa pro mNKR-P1C izotyp 1 a 2 (*obrázek 5-4B a C*). Na tomto obrázku je také vidět, že IPTG silně podporuje expresi rekombinantního proteinu na úkor ostatních bakteriálních proteinů, na jejichž obvyklou syntézu již dostatečně nepostačuje kapacita transkripčního a translačního aparátu buňky. Všechny zkoušené kultury tak byly produkční a byly použity pro velkoobjemovou produkci proteinů.



Obrázek 5-4: Analýza produkčních kultur s a bez indukce produkce proteinů. Příslušné kultury označené číslem (1 či 2) byly analyzovány bez indukce produkce proteinů (dráhy označené „-“) a s indukcí produkce proteinů IPTG (dráhy „+“). Jednotlivé elektroforeogramy odpovídají proteinům mNKR-P1A (**A**), mNKR-P1C izotypu 1 (**B**) a mNKR-P1C izotypu 2 (**C**). Dráha M obsahuje proteinové standardy o známých hmotnostech.

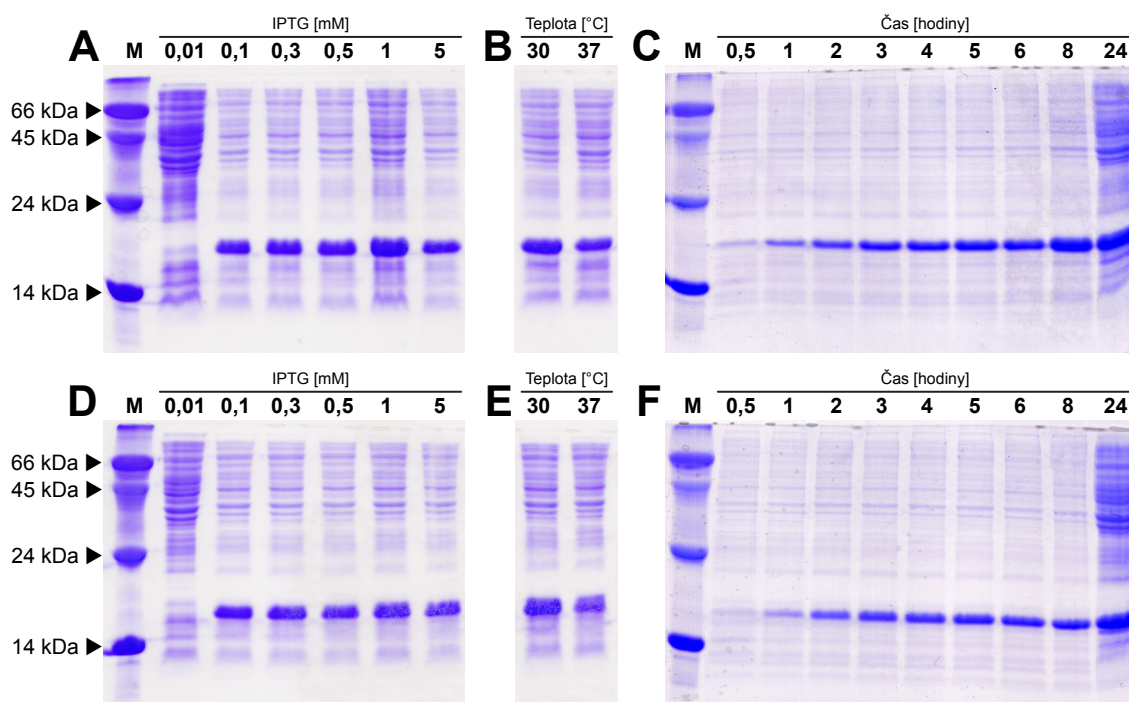
5.3.2. Optimalizace produkce rekombinantních proteinů

Hlavním cílem optimalizace produkce proteinů bylo vytěžit co největší množství proteinů v co nejkratším čase a s co nejnižšími náklady.

Mezi stanovovanými parametry byly koncentrace induktoru (IPTG), teplota a délka produkce. Při stanovování optimálních podmínek produkce bylo postupováno podle kapitoly 4.2.3. Odebrané vzorky byly následně zanalyzovány elektroforeticky, metodou redukující SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu. Současně byla spektrofotometricky stanovena růstová křivka produkčních kultur jednotlivých rekombinantních proteinů při vlnové délce 550 nm (obrázek 5-6 strana 53).

Elektroforeogramy zobrazující vliv koncentrace IPTG (obrázek 5-5A pro mNKR-P1A a 5-5B pro mNKR-P1C izotyp 2) dokazují, že při koncentraci 0,01 mM IPTG nedocházelo k prakticky žádné produkci proteinu, zatímco při koncentraci 0,1 mM IPTG byly již proteiny produkovány silně. Je zjevné, že při ještě vyšších koncentracích (0,3 mM IPTG a vyšších) se tato míra produkce již nezvyšuje, ani výrazně nemění.

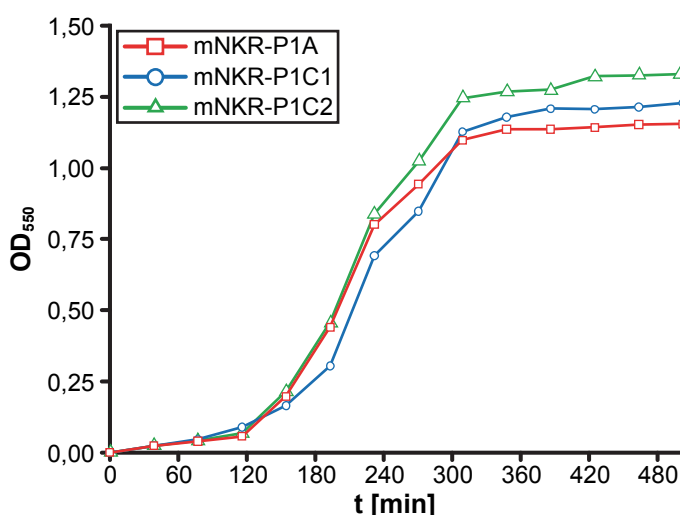
Vliv teploty na produkci proteinů (obrázek 5-5B pro mNKR-P1A a 5-5E pro mNKR-P1C izotyp 2) je prakticky stejný jak při 30 °C, tak při 37 °C. S přihlédnutím k těmto faktům je produkce za vyšší teploty časově výhodnější, protože bakterie rostou rychleji.



Obrázek 5-5: Analýza proteinového složení bakteriálních kultur během optimalizace produkce proteinů za různých podmínek. Optimalizace koncentrace IPTG [mM] je vyobrazena na gelech **A** (mNKR-P1A) a **D** (mNKR-P1C izotyp 2), teploty [°C] na gelech **B** (mNKR-P1A) a **E** (mNKR-P1C izotyp 2) a délky produkce v hodinách na gelech **C** (mNKR-P1A) a **F** (mNKR-P1C izotyp 2). Dráha M obsahuje proteinové standardy o známých hmotnostech.

Z hlediska délky produkce (strana 52, *obrázek 5-5C* pro mNKR-P1A a *5-5F* pro mNKR-P1C izotyp 2) je evidentně produkčního maxima dosaženo po třech až čtyřech hodinách. Je zajímavé, že k mírné produkci proteinu dochází už během první půlhodiny po indukci IPTG. V případě čtyřadvacetihodinové produkce se opět začíná zvyšovat exprese ostatních bakteriálních proteinů, která je vlivem IPTG v předchozích drahách s daleko kratší délkou produkce (0,5 – 8 hodin) značně potlačena. Tyto proteiny jsou nežádoucí, protože by ztěžovaly proces purifikace.

Na základě tohoto stanovení byly vybrány jako nejvhodnější podmínky produkce 0,1 mM IPTG, teplota 37 °C a délka produkce 3 hodiny. Jelikož podmínky produkce dvou izotypů mNKR-P1C se ukázaly být shodné, je vyobrazena analýza optimalizace pouze projeden z nich a to mNKR-P1C izotyp 2.



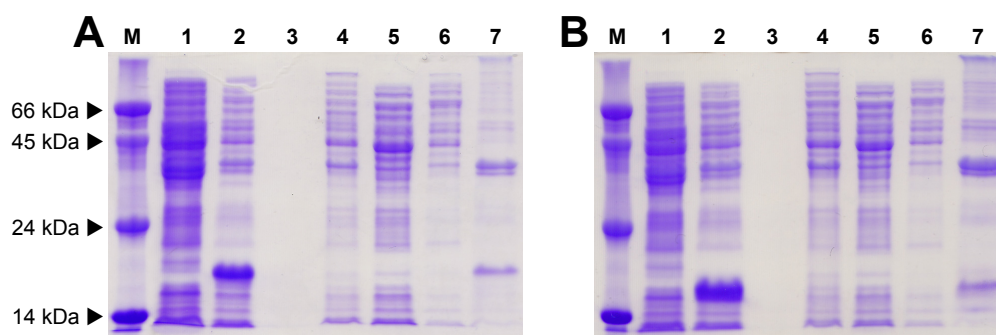
Obrázek 5-6: Růstová křivka produkčních bakteriálních kultur jednotlivých proteinů v LB-médiu. Růstová křivka byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 550 nm.

5.3.3. Určení místa exprese rekombinantních proteinů

Aby nedocházelo ke ztrátám proteinů během jejich izolace z bakterií, bylo potřeba se ujistit, zda se skutečně proteiny produkují do inkluzních tělísek, která jsou z bakterií následně izolována. Během produkce proteinů a izolace inkluzních tělísek byly proto v určitých fázích odebírány frakce, které byly následně analyzovány na 15% polyakrylamidovém gelu metodou redukující SDS-PAGE. Postupováno bylo tak, jak je uvedeno v kapitole 4.2.4.

Na *obrázku 5-7* na straně 54 jsou zobrazeny výsledné elektroforeogramy analýzy vzorků odebíraných během produkce rekombinantních proteinů a izolace inkluzních tělísek z buněčných kultur. Kvůli velké podobnosti obou izotypů mNKR-P1C je vyobrazena analýza pouze pro izotyp 2, protože dosažené výsledky jsou pro oba dva izotypy v tomto případě prakticky stejně. První dvě dráhy na obou gelech ilustrují vliv IPTG na buněčnou kulturu, kdy v dráze č. 1 (těsně před indukcí exprese) je vidět, že se rekombinantní protein neprodukuje, zatímco v dráze č. 2 (po indukci exprese 0,1 mM IPTG) už je vlivem induktoru potlačena exprese ostatních bakteriálních proteinů na úkor

rapidně zvýšené exprese rekombinantního proteinu. Dráha č. 3 (produkční médium po stočení bakteriální kultury) u obou rekombinantních proteinů jasně ukazuje, že protein není produkován do média. Rovněž nedochází ke ztrátám při izolaci inkluzních tělísek, jak dokazuje analýza použitých izolačních roztoků (dráhy č. 4 – 6; viz popisek obrázku 5-7). V drahách č. 7 je vidět, že protein je produkován do inkluzních tělísek, protože pouze zde, s výjimkou drah č. 2, se vyskytuje velká zóna odpovídající molekulovým hmotnostem rekombinantních proteinů (17 – 19 kDa). V drahách č. 7 se rovněž nachází další výrazné zóny cca kolem 40 kDa. Ty byly analyzovány na hmotnostním spektrometru Mgr. Danielem Kavanem, PhD. a jedná se o blíže neurčený membránový protein bakterií *E. coli*, který však díky své velikosti nevádí při následné purifikaci rekombinantních proteinů a zřejmě není ani správně renaturován, protože v následných purifikacích pozorován nebyl.



Obrázek 5-7: Lokalizace exprese rekombinantního proteinu. Lokalizace exprese rekombinantních mNKR-P1A (A) a mNKR-P1C izotypu 2 (B). Popis drah: 1 – bakteriální kultura před indukcí IPTG; 2 – bakteriální kultura před ukončením kultivace; 3 – LB-médium po odstředění bakteriálních buněk; 4 – sacharózový pufr po odstředění; 5 – pufr s detergentem po odstředění; 6 – promývací pufr po odstředění; 7- vzorek výsledného sedimentu – inkluzních tělísek; M – proteinové standardy o známých hmotnostech.

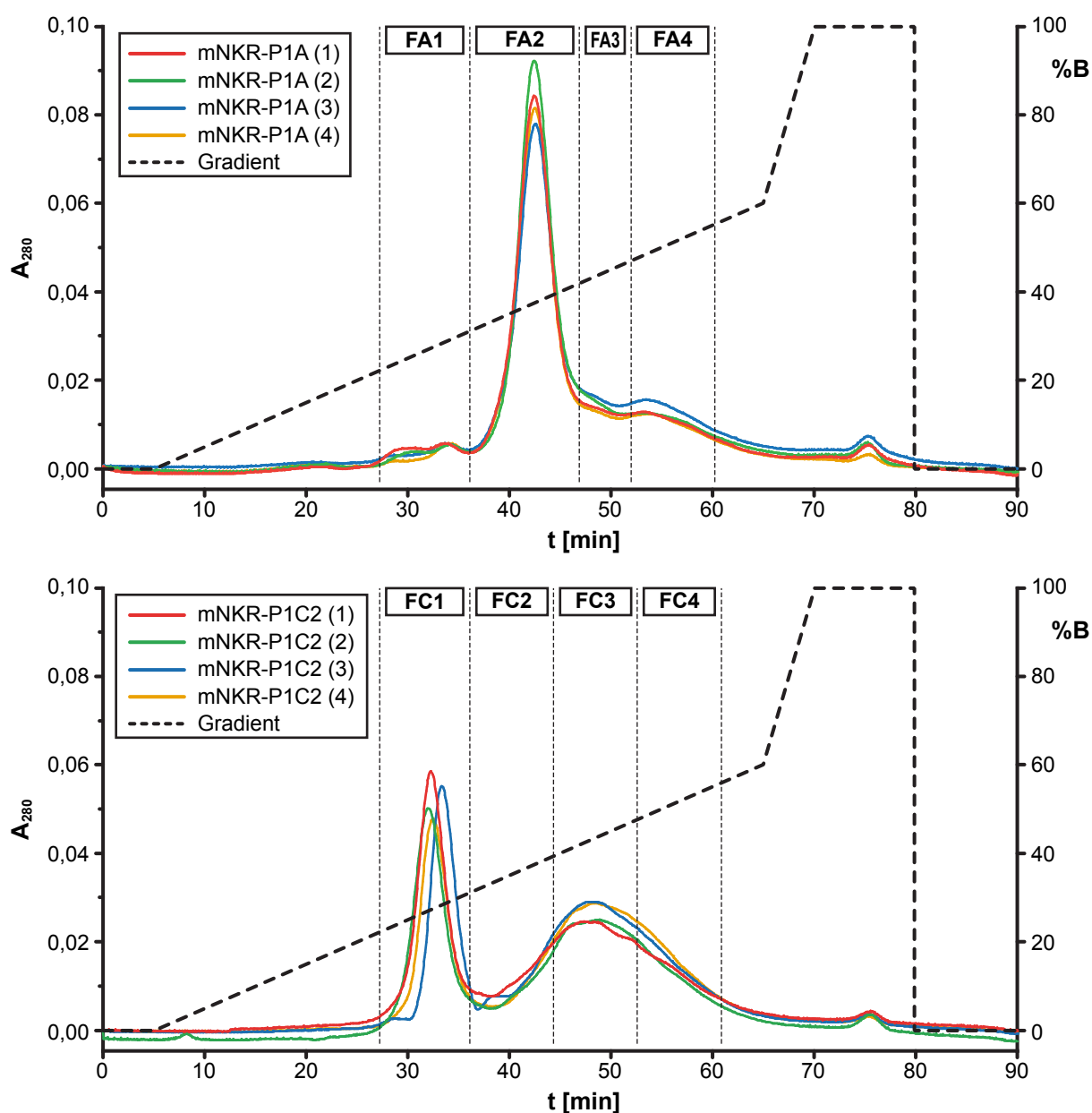
5.4. OPTIMALIZACE RENATURACE MNKR-P1A A MNKR-P1C IZOTYPU 2

Renaturace byla provedena metodou rychlého naředění *in vitro*, kdy se do velkého objemu renaturačního roztoku pomalu přikapává roztok denaturovaného proteinu (asi 1 kapka za sekundu). V tomto roztoku je obsažen L-arginin, který funguje jako nízkomolekulární chaperon, redoxní systém usnadňující tvorbu disulfidických můstků a další složky, které umožňují správné složení proteinu a stabilizují pH.

5.4.1. Separace na Q-Sepharose

Renaturace mNKR-P1A a mNKR-P1C izotypu 2 byla provedena tak, jak je uvedeno v kapitole 4.3.1. Poté byly vzorky dialyzovány, zahuštěny ultrafiltrací a analyzovány chromatograficky postupně na Q-Sepharose a Superdexu 75 HR 10/300. Z výsledných ploch píků získaných gelovou filtrací byly vybrány nejvhodnější podmínky renaturace.

Na *obrázku 5-8* jsou vyobrazeny v překryvu chromatogramy ilustrující separaci obou proteinů mNKR-P1A a mNKR-P1C izotypu 2 iontově výměnnou chromatografií na Q-Sepharose. Čísla v závorce v levém horním rohu každého chromatogramu odpovídají pufrům uvedeným v kapitole 4.3.1. Je zřejmé, že jednotlivé renaturační podmínky

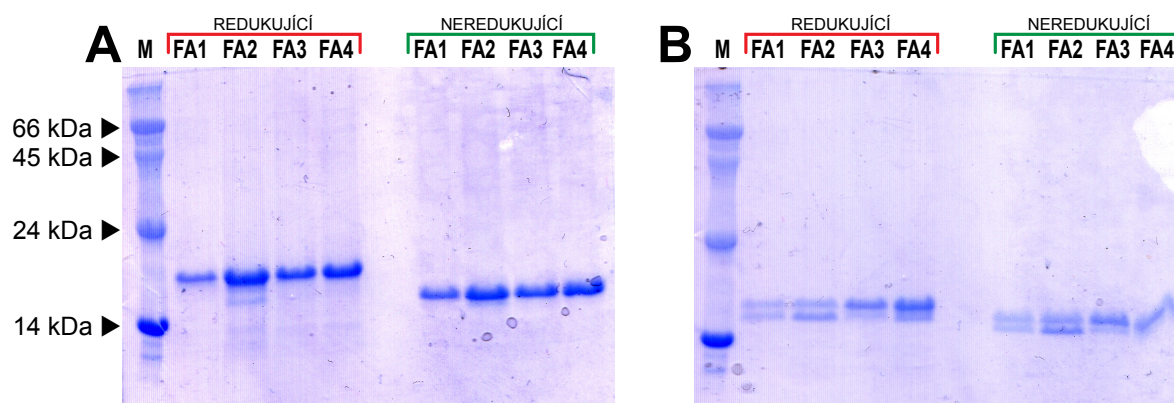


Obrázek 5-8: Chromatogram separace proteinů na Q-Sepharose. Popisky křivek jsou v legendě na obrázku. Čísla v závorkách udávají číslo pufru, v němž byl protein renaturován.

neovlivňují renaturaci obou dvou rekombinantních proteinů takřka vůbec – křivky jsou v rámci jednotlivých rekombinantních proteinů srovnatelné. Avšak oba rekombinantní proteiny se značně liší v úspěšnosti renaturace. Jak je vidět na chromatogramu mNKR-P1C izotypu 2 za píkem s retenčním časem cca 32 minut se nachází široký pík s maximem v cca 49 minutách. Vzhledem k elučnímu profilu se jedná o špatně a nahodile složený protein, čemuž odpovídá i velká šíře a neostrost píku. U mNKR-P1A se tato špatně složená frakce vyskytuje rovněž, avšak v mnohem menší míře (pík v cca 55 minutě). Správně složené proteiny tudíž reprezentují píky s retenčním časem 42 minut pro mNKR-P1A (frakce FA2), respektive 32 minut pro mNKR-P1C izotyp 2 (FC1). Jednotlivé frakce, jež jsou vyznačeny v chromatogramech na *obrázku 5-8* na straně 55, byly následně analyzovány SDS-PAGE a tato analýza je popsána v následující kapitole.

5.4.2. Analýza frakcí získaných na Q-Sepharose

Frakce získané separací renaturačních roztoků na Q-Sepharose, jež jsou vyznačeny v chromatogramech na *obrázku 5-8* straně 55, byly následně analyzovány redukcí a neredukcí SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu, aby bylo určeno jejich složení. Výsledné elektroforeogramy jsou vyobrazeny na *obrázku 5-9* a dokazují, že frakce jsou složeny z exprimovaných rekombinantních proteinů a jsou poměrně čisté. Je také možné si povšimnout posunu zón odpovídajících rekombinantním proteinům (17 – 19 kDa) za redukcí a neredukcí podmínek. Tento posun je způsoben přítomností disulfidových vazeb v rekombinantních proteinech v neredukčním prostředí, které umožňují proteinu snadnější průchod gelem díky větší soudržnosti molekul. Zároveň bylo potvrzeno předchozí tvrzení, že všechny analyzované frakce jsou složeny z příslušného exprimovaného rekombinantního proteinu, ale s přihlédnutím k elučním

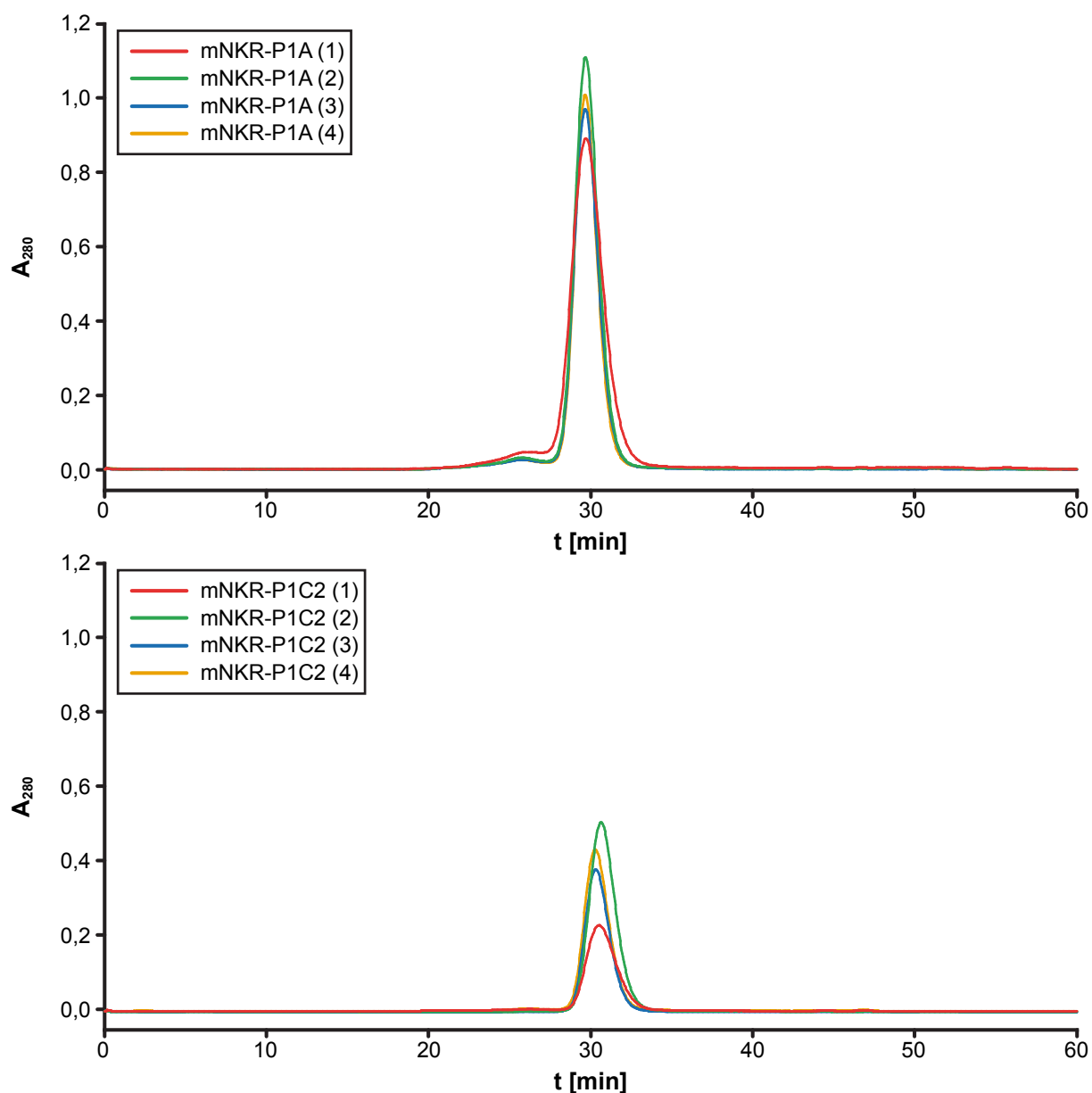


Obrázek 5-9: Elektroforeogramy analýzy frakcí z Q-Sepharosy. Označení jednotlivých drah odpovídá frakcím vyznačeným na *obrázku 5-8* na straně 55.

profilům z *obrázku 5-8* na straně 55 se až na frakci FA2 pro mNKR-P1A (*obrázek 5-9A* str. 56) a frakci FC1 pro mNKR-P1C izotyp 2 (*obrázek 5-9B* str. 56) u obou proteinů jedná o špatně složené molekuly. Přítomnost dvou výrazných zón hned nad sebou na *obrázku 5-9B* na straně 56 byla pravděpodobně způsobena nedostatečnou inhibicí proteáz a nebyly již při dalších produkcích pozorovány.

5.4.3. Přečištění proteinových preparátů gelovou filtrací

Pro konečné přečištění proteinových preparátů byla zvolena gelová filtrace na koloně Superdex 75 HR 10/300. Na této koloně už byly separovány pouze vybrané frakce z Q-Sepharosy obsahující správně složené rekombinantní proteiny mNKR-P1A (frakce



Obrázek 5-10: Chromatogram separace proteinů na Superdexu 75 HR 10/300. Popisky křivek se nachází v legendě na obrázku. Čísla v závorkách udávají číslo pufru, v němž byl protein renaturován.

FA2, *obrázek 5-8* na straně 55) a mNKR-P1C izotyp 2 (frakce FC1, tentýž obrázek). Postupováno bylo tak, jak je uvedeno v kapitole 4.4.2.

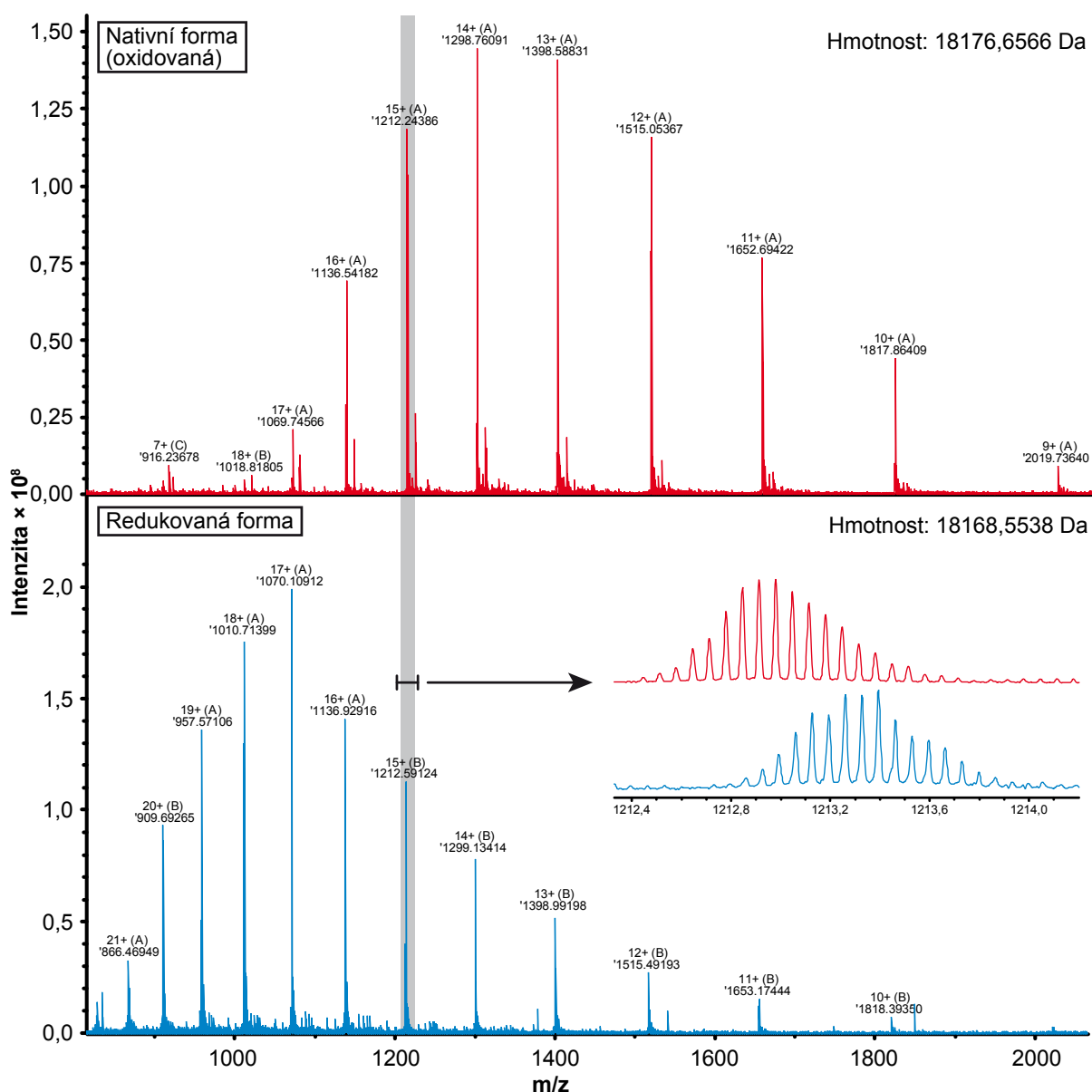
Výsledné chromatogramy na *obrázku 5-10* na straně 57 dobře ilustrují čistotu preparátu získaného předchozí separací na Q-Sepharose. Byl získán prakticky jediný pík, jež reprezentuje jednotně složený protein, čemuž opět napovídá eluční profil. Je také zřetelně vidět, že účinnost renaturace mNKR-P1C izotypu 2 je asi poloviční ve srovnání s mNKR-P1A. Výtěžky činily zhruba 12 mg mNKR-P1A a 8 mg mNKR-P1C izotypu 2 z jednoho litru produkčního média (stanoveno metodou podle Bradfordové).

Na základě vyobrazených dat byly jako nejvhodnější podmínky renaturace pro oba proteiny vybrány 1 M L-arginin, pH 9,0; 9 mM cysteamin a 3 mM cystamin, což odpovídá renaturačnímu roztoku č. 2 z kapitoly 4.3.1.

5.4.4. Ověření identity obou proteinů

Ve chvíli, kdy byl získán čistý proteinový preparát na koloně Superdex 75 HR 10/300 byla ověřena identita mNKR-P1A a mNKR-P1C izotypu 2 hmotnostní spektrometrií. Tou byly stanoveny monoizotopické hmotnosti obou proteinů při zapojení všech disulfidových můstků (nativní stav) na 18176,6566 Da pro mNKR-P1A (chyba 0 ppm) a 17306,4277 Da pro mNKR-P1C izotyp 2 (chyba 1,9 ppm). Uvedené hmotnosti velmi přesně souhlasí s teoreticky předpovězenými monoizotopickými hmotnostmi produkovaných proteinových řetězců.

Byly také stanoveny jejich monoizotopické hmotnosti po redukci redukčním činidlem TCEP. Na *obrázku 5-11* na straně 59, je vyobrazeno hmotnostní spektrum mNKR-P1A pro protein v nativním stavu (horní spektrum) a pro redukci (dolní spektrum). Zároveň je na jednom z píků ukázán charakteristický posun, jež byl způsoben redukcí, tedy přítomností vodíkových atomů na thio skupinách cysteinů oproti oxidovanému stavu. Hmotnostní spektrum bylo naměřeno i pro mNKR-P1C izotyp 2 se stejným výsledkem. Hmotnosti proteinů po redukci činily 18176,6566 Da u mNKR-P1A a 17306,4277 Da u mNKR-P1C izotypu 2. Z rozdílů hmotností oxidovaného a redukovaného stavu obou proteinů vyplývá, že ve své molekule každý obsahuje 4 disulfidové můstky.



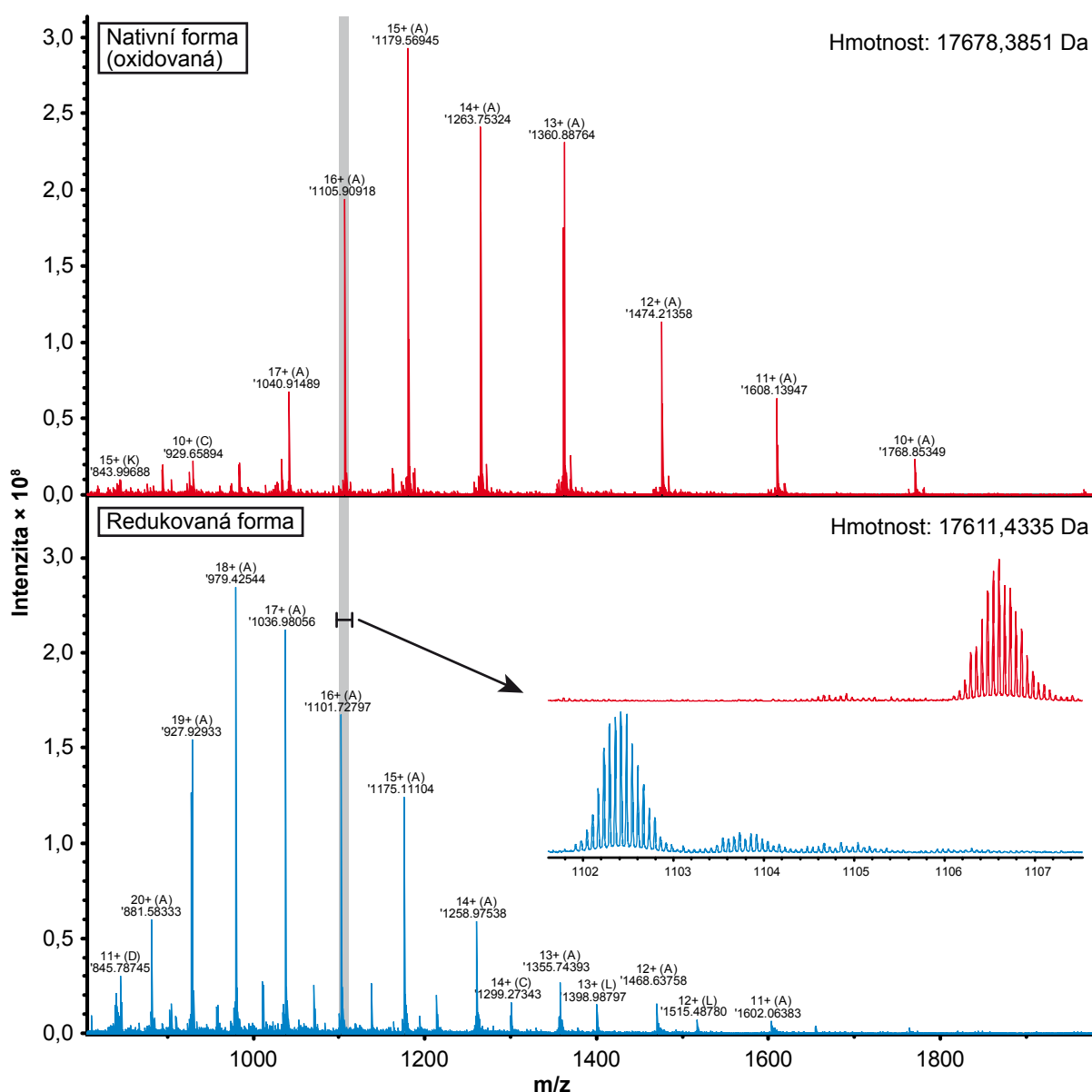
Obrázek 5-11: Hmotnostní spektrum nativního a redukovaného mNKR-P1A. Spektra zobrazují nativní protein (nahore) a redukovaný protein (dole). Šedě podbarvená oblast velkých grafů je v detailu vyobrazena v malém grafu dole, kde je vidět posun těchto píků mezi nativní a redukovanou formou proteinu.

5.5. OPTIMALIZACE RENATURACE MNKR-P1C IZOTYPU 1

Z důvodů modifikace Cys⁸⁸ tohoto rekombinantního proteinu cystaminem, nebylo možné renarovat mNKR-P1C izotyp 1 metodou uvedenou v kapitole 4.3.1. Bylo proto přistoupeno k sérii dalších optimalizačních experimentů mající za cíl odstranit tento problém.

5.5.1. Analýza monomerního mNKR-P1C izotypu 1

Jak již bylo řečeno v předchozím odstavci, při renaturaci v pufrch uvedených v tabulce 4-6 na straně 37, docházelo k vazbě redoxního činidla cysteaminu na jeden z cysteinů. Tato vazba byla experimentálně dokázána změřením hmoty oxidované a redukované (za použití redukčního činidla TCEP) formy tohoto proteinu na hmotnostním spektrometru. Naměřená spektra jsou vyobrazena na obrázku 5-12. Z těchto spekter byla odečtena hmotnost jednotlivých forem, která činí 17678,3851 Da pro nativní (oxidovanou) formu a 17611,4335 Da pro redukovanou formu. Z rozdílu těchto hmotností a odečtení vodíkových atomů na thio skupinách cysteinů (celkem 9)



Obrázek 5-12: Hmotnostní spektra proteinu mNKR-P1C izotypu 1, modifikovaného vazbou s cysteaminem, před a po redukcii. Detaily jsou uvedeny v textu.

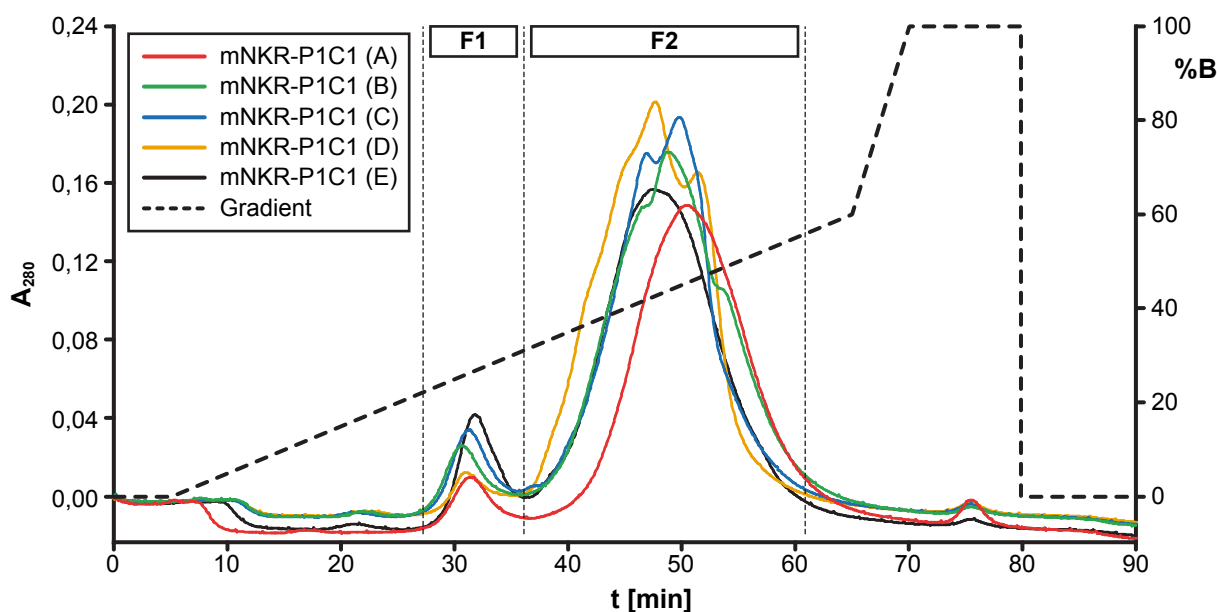
redukované formy činí absolutní hodnota rozdílu hmotností 76,0221 Da, což odpovídá molekulové hmotnosti oxidovaného cysteaminu a po přičtení chybějícího vodíkového atomu tedy celkem 77,0299 Da. Jak bylo posléze prokázáno stanovením disulfidických vazeb v proteinu (*obrázek 5-22* na straně 68), cysteamin se váže na Cys⁸⁸.

Jelikož se zjevně jedná o nežádoucí modifikaci, bylo potřeba změnit postup tak, aby alespoň dostatečně velká část z celkového množství renaturovaného proteinu zůstala bez této modifikace.

5.5.2. Optimalizace koncentrací redoxních partnerů v renaturačním pufru

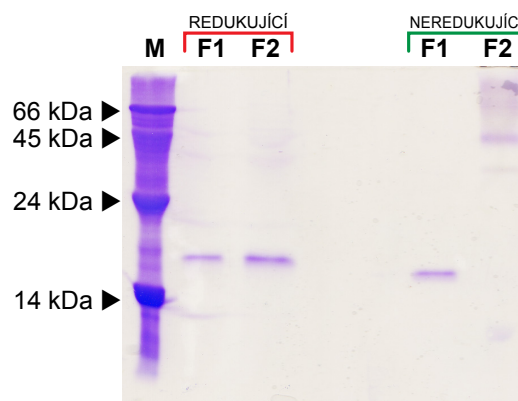
V první fázi byly testovány různé koncentrace a koncentrační poměry redoxního systému cysteamin-cystamin. Celý postup renaturace se tak od postupu, jež je uveden v kapitole 4.3.1 lišil pouze v těchto bodech. Složení renaturačních pufrů je popsáno v *tabulce 4-7* na straně 38.

Výsledné chromatogramy ze separace těchto pufrů (A – E) na Q-Sepharose jsou vyobrazeny na *obrázku 5-13*. Eluční profily jsou odlišné, oproti renaturaci srovnatelného mNKR-P1C izotypu 2 za podmínek uvedených v kapitole 4.3.1. Jak již bylo ověřeno na tomto analogickém mNKR-P1C izotypu 2, píky s elučním časem 32 minut odpovídají správně složenému proteinu, zatímco velké píky s maximem okolo 48 minut jsou špatně složené, nebo obsahují agregáty. Tuto skutečnost dokládá i analýza frakcí vyznačených na *obrázku 5-13* metodou redukující a neredukující SDS-PAGE na 15% gelu, jež je vyobrazena pro frakce získané renaturací v roztoku A (křivka A) na



Obrázek 5-13: Analýza renaturačních pufrů mNKR-P1C izotypu 1 na Q-Sepharose. Čísla v závorce v legendě grafu odpovídají číslům renaturačních pufrů z tabulky 4-7 na straně 38.

obrázku 5-14 na straně 62. V podstatě stejný průběh byl pozorován i pro ostatní renaturační roztoky (B – E), jen s menším zastoupením agregátů, které jsou v neredukující dráze F2 na obrázku 5-14 zřetelné jako zóny v horní části dráhy. Dimer však ve frakci správně složeného proteinu (F1) nevzniká a lze pozorovat pouze zónu v oblasti 17 – 18 kDa odpovídající monomerní formě mNKR-P1C izotypu 1. Jelikož tento postup tedy neumožnil získání většího množství správně složeného proteinu, ba naopak zhoršil celkový výtěžek, bylo v druhé fázi přistoupeno k jeho další modifikaci.

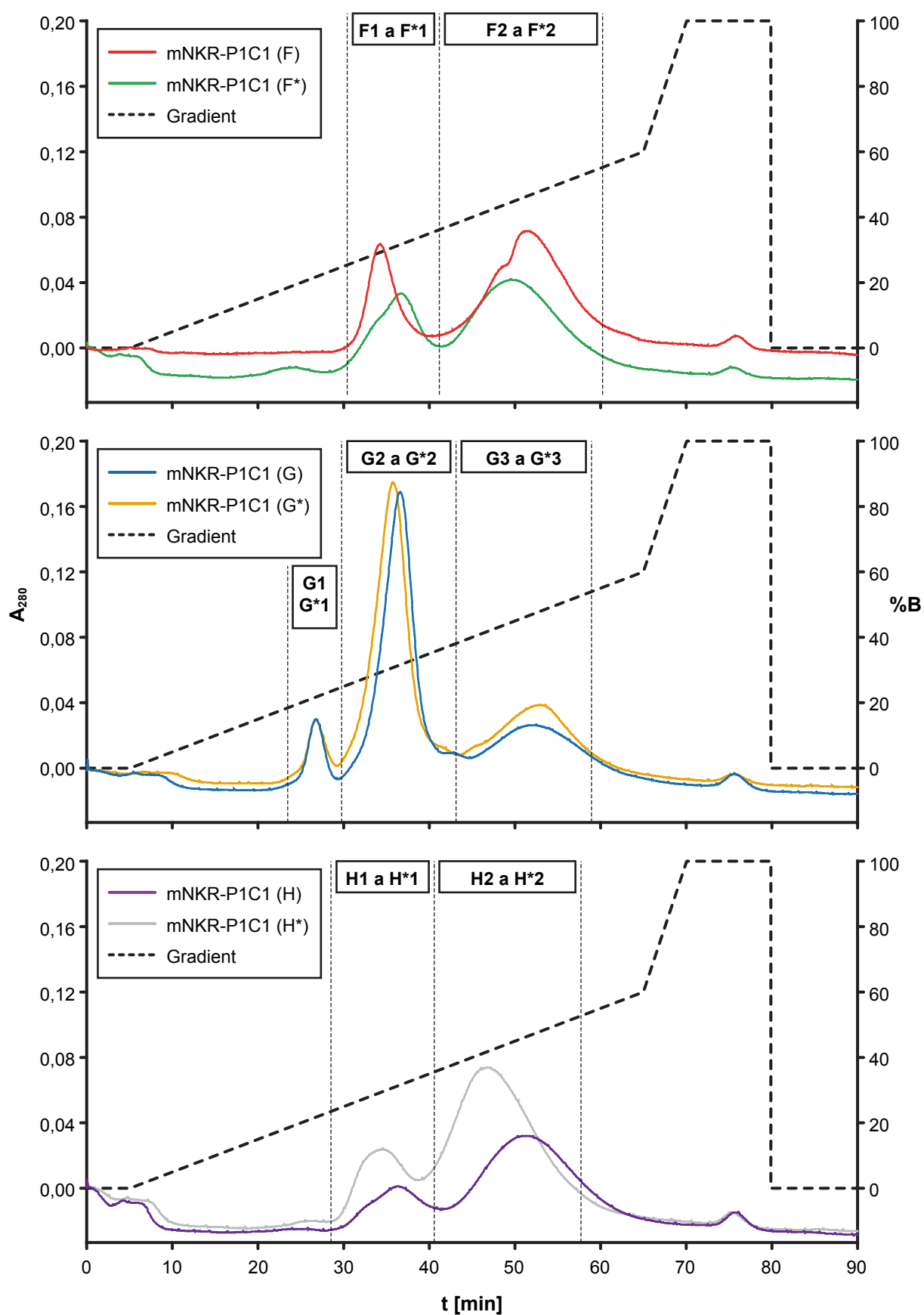


Obrázek 5-14: Analýza frakcí mNKR-P1C izotypu 1 získaných separací na Q-Sephrose. Jedná se o frakce křivky A z obrázku 5-13. U dalších byl pozorován stejný průběh, jen s menším zastoupením agregátů.

5.5.3. Modifikace renaturační metody

Jelikož se úprava koncentrací redoxních partnerů v renaturačním roztoku ukázala jako nedostatečná, bylo přistoupeno k dalším modifikacím. Tyto modifikace byly provedeny celkem tři. První byla změna redoxního systému na alternativní – redukovaný a oxidovaný glutathion. Druhou modifikací byla renaturace proteinu v renaturačním roztoku bez redoxního systému. Ten byl však posléze přidán přikapáním směsi cysteaminu a cystaminu na konečnou koncentraci 9 mM cysteamin a 3 mM cystamin. Poslední změnou bylo snížení viskozity renaturačních roztoků, kvůli snížení flexibility krčku rekombinantního proteinu, přidáním glycerolu do jeho konečné koncentrace 10 % (v/v). Složení a značení zmíněných modifikovaných renaturačních roztoků je shrnuto v *tabulce 4-8* na straně 38.

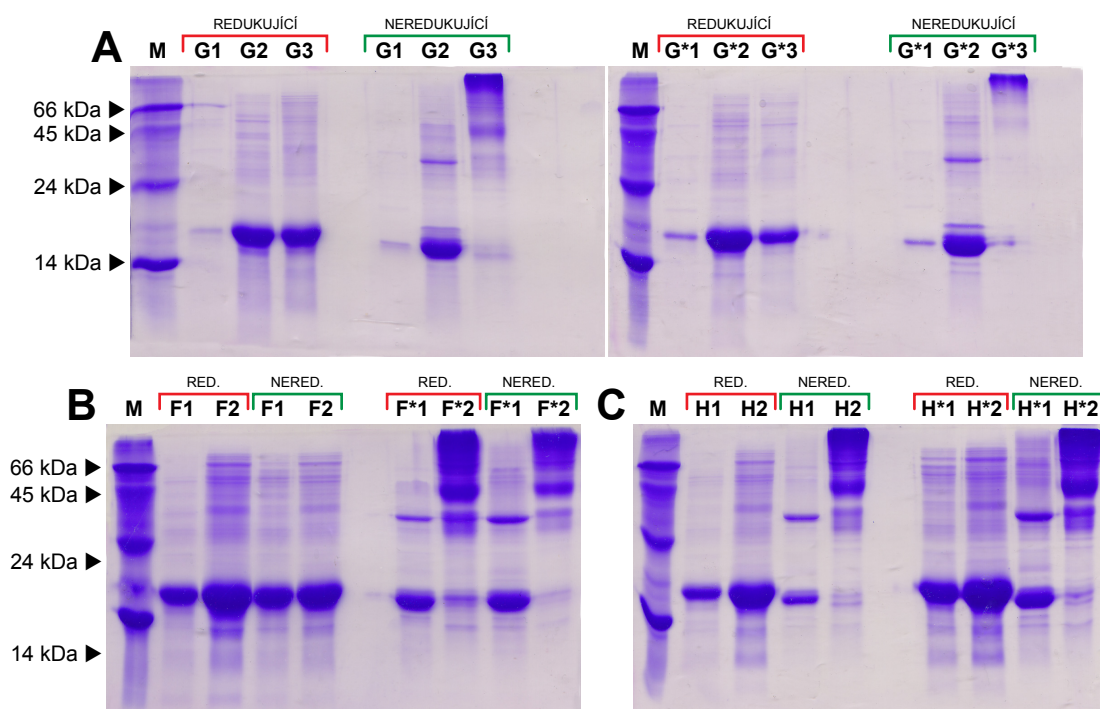
Vliv provedených modifikací na renaturaci rekombinantního proteinu je ukázán na obrázku 5-15 na straně 63. Na těchto chromatogramech je vidět, že změna redoxního systému zvýšila výtěžek správně složeného proteinu (křivka G a G*) oproti předchozímu cysteamin-cystamin (křivka F a F*). Výsledek renaturace metodou pozdějšího přidání redoxního systému cysteamin-cystamin (křivky H a H*) v podstatě odpovídá datům získaným renaturací v roztoku bez redoxního systému (*obr. 5-13* na straně 61, křivka A). Vliv viskozity na úspěšnou renaturaci je zanedbatelný, protože při porovnání účinnosti renaturace v renaturačních roztocích s 10% glycerolem (křivky F*, G*, H*) a bez glycerolu (křivky F, G, H) bylo dosaženo prakticky stejných výsledků.



Obrázek 5-15: Analýza úspěšnosti renaturace mNKR-P1C1 izotypu 1 v modifikovaných renaturačních pufrách separací na Q-Sepharose. Označení jednotlivých frakcí se týká shodně označených křivek.

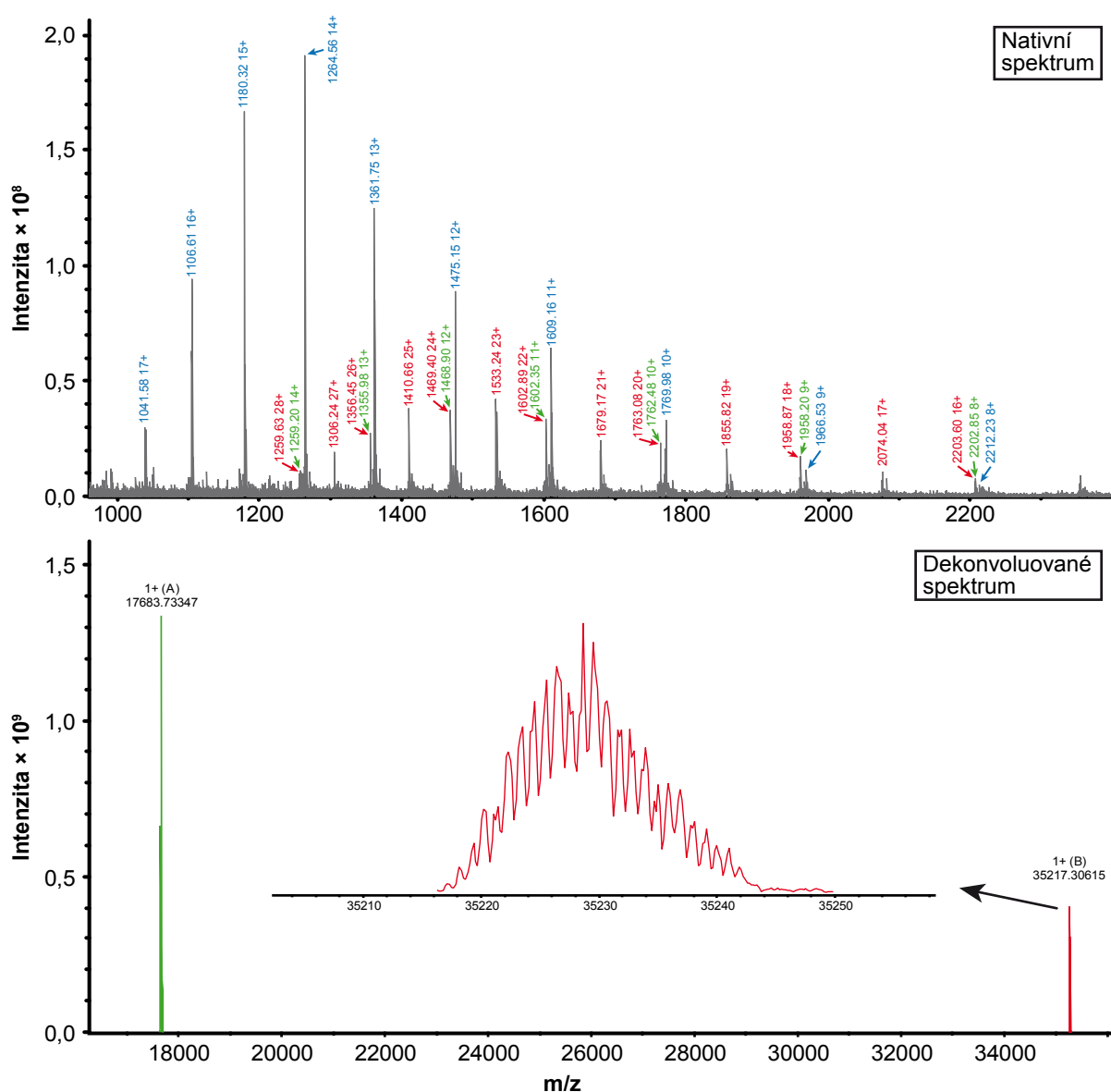
Následně byly příslušné frakce vyznačené na *obrázku 5-15* straně 63, získané separací na Q-Sepharose, podrobeny analýze metodou redukující a neredučující SDS-PAGE na 15% gelu. Tyto elektroforeogramy jsou vyobrazeny na *obrázku 5-16*, kde popisky jednotlivých drah odpovídají frakcím vyznačeným na *obrázku 5-15* na straně 63. Je zde vidět, že všechny analyzované frakce obsahují proteinovou složku a v závislosti na renaturačních podmínkách se tvoří rovněž agregáty (výrazné zóny od 45 kDa výše).

Změna redoxního systému na glutathion naneštěstí vedla ke stejnému výsledku jako při renaturaci s cysteaminem a cystaminem – hlavní analyzovaná frakce z renaturace za přítomnosti glutathionu (*obrázek 5-16A* na straně 64, dráha G2 a G*2) obsahuje převážně monomerní mNKR-P1C izotyp 1 a tvoří se malé množství dimerního proteinu (na témže obrázku zóna mezi 24 kDa a 45 kDa odpovídající velikosti dimerního proteinu cca 35 kDa). Frakci G3 a G*3 tvoří agregáty; G1 a G*1 malé množství monomerního proteinu. Renaturace metodou za přítomnosti cysteaminu a cystaminu (*obrázek 5-16B* na straně 64) bez glycerolu neumožnila vzniku takřka žádného množství dimeru, avšak v 10% glycerolu se již dimer tvořil (frakce F*1). V případě odloženého přidání redoxního systému cystamin-cysteamin (*obrázek 5-16C* na straně 64) se dimer tvoří jak v přítomnosti 10% glycerolu, tak bez něj. Jak je vidět v dráze H1 v neredučujícím prostředí, tento dimer tvoří cca 30 – 40 % z frakce.

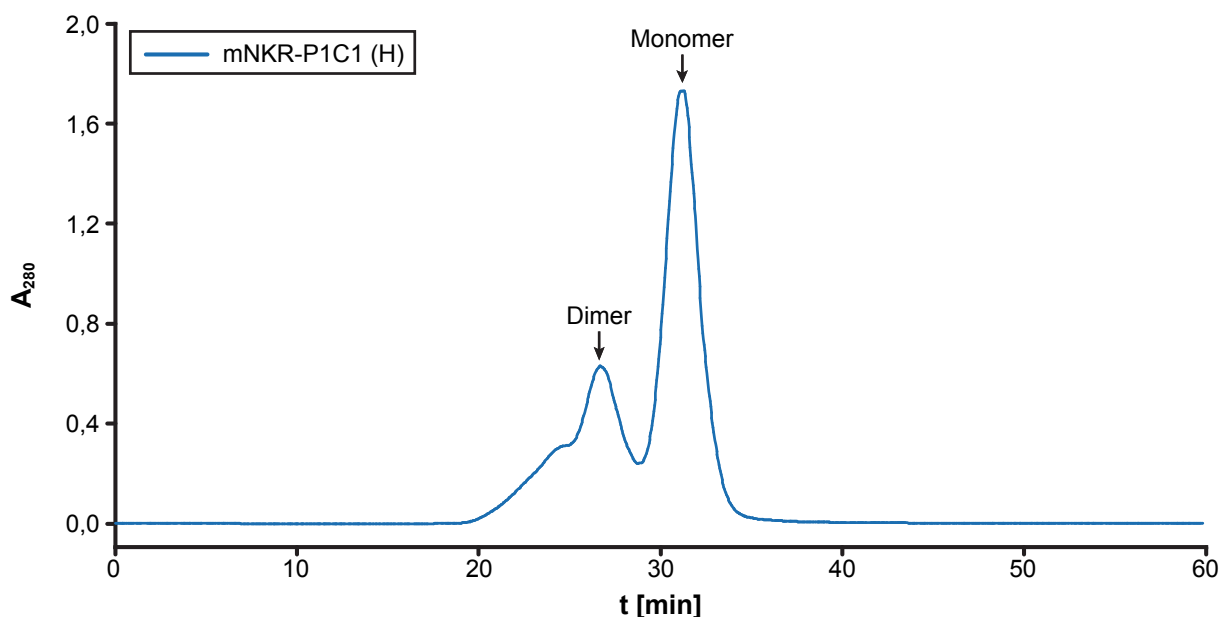


Obrázek 5-16: Elektroforeogramy analýzy frakcí z Q-Sepharosy. Popisky jednotlivých drah odpovídají označení frakcí vyznačených na *obrázku 5-15* na straně 63.

Tato metoda tedy byla nakonec zvolena jako nejvhodnější k získání dimerního mNKR-P1C izotypu 1, jež byl následně izolován separací na Superdexu 75 HR 10/300 (obrázek 5-18 str. 66), kde se podařilo dimer oddělit od monomeru, což bylo potvrzeno analýzou frakce dimerního proteinu na hmotnostním spektrometru (obr. 5-17). Celková nativní hmotnost dimerního mNKR-P1C izotypu 1 byla stanovena na 35204,4478 Da a redukovaná (tedy již monomerní formy) na 17611,5326 Da. Z rozdílů hmotností je tak patrné, že celkový počet disulfidových můstků v dimerním proteinu je 9, kde 4 disulfidové můstky náleží každé podjednotce a jedna kovalentně tyto monomery váže skrze Cys⁸⁸ na obou molekulách. Výtěžek dimerního mNKR-P1C izotypu 1 činil z jednoho litru LB-média asi 1 – 2 mg.



Obrázek 5-17: Hmotnostní spektra získaná měřením vzorku, jež obsahoval dimerní mNKR-P1C izotyp 1. V nativním spektru se objevuje monomerní forma modifikovaná cysteaminem (modře), monomerní forma vzniklá tvrdostí ionizace (zeleně) a dimerní forma (červeně). Nativní spektrum bylo dekonvoluováno a získaný pík odpovídající dimernímu proteinu je zobrazen v detailu.

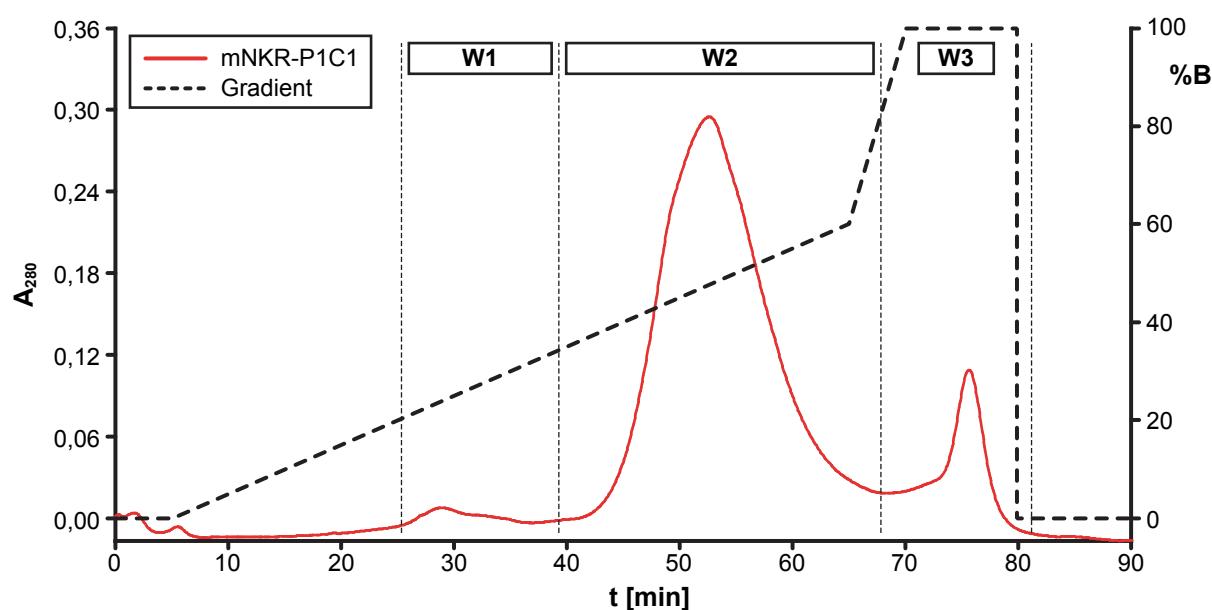


Obrázek 5-18: Separace dimerní a monomerní formy mNKR-P1C izotypu 1 pomocí Superdexu 75 HR 10/300. Jednotlivé píky jsou popsány přímo v grafu. Jedná se o separaci frakce F1 z obrázku 5-16 na straně 64.

5.5.4. Renaturace mNKR-P1C izotypu 1 metodou podle C. Weie et al.

Namísto úpravy původního způsobu renaturace, jež je uveden v kapitole 4.3.1, byla rovněž vyzkoušena jiná metoda renaturace, a to podle C. Weie et al. [77]. Postup práce je uveden v kapitole 4.3.2. Renaturační roztok s proteinem byl analyzován separací na Q-Sepharose podle kapitoly 4.4.1.

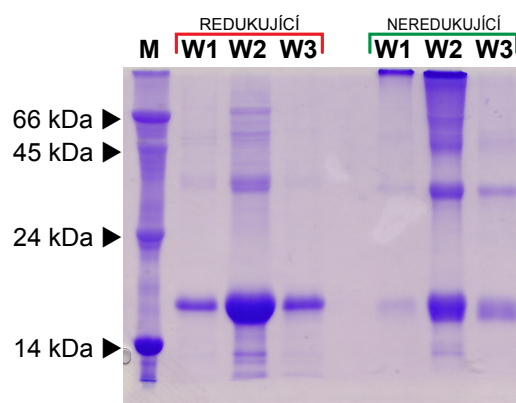
Na obrázku 5-19 je zobrazen výsledný chromatogram separace mNKR-P1C izotypu 1 renaturovaného výše zmíněnou metodou na Q-Sepharose. Eluční profil je obdobný jako



Obrázek 5-19: Analýza úspěšnosti renaturace mNKR-P1C izotypu 1 podle C. Weie et al. [77] na Q-Sepharose.

i při předchozích separacích tohoto proteinu na stejné koloně. První je málo znatelný pík s maximem kolem 29 minut (frakce W1 na *obrázku 5-19* str. 66). Druhý je pík s maximem v 52 minutě (frakce W2 tentýž obrázek) a třetí v 76 minutě (frakce W3 na témže obrázku).

Tento eluční profil by napovídal tomu, s přihlédnutím k předchozím (*obrázky 5-13* str. 61 a *5-15* str. 63), že naprostá většina proteinu agregovala, nebo je špatně složena. Proto byly jednotlivé frakce vyznačené na *obrázku 5-19* a straně 66 analyzovány metodou redukující a neredukující SDS-PAGE na 15% gelu. Získaný elektroforeogram se nachází na *obrázku 5-20*. Je z nich zřejmé, že hlavní pík (frakce W2) obsahuje monomerní, dimerní a multimerní, či agregovanou formu mNKR-P1C izotypu 1. Frakce W1 obsahuje hlavně monomerní formu a nadějně vypadající frakce W3 i dimerní. Avšak analýzou těchto tří frakcí (W1 – W3) na hmotnostním spektrometru bylo prokázáno, že se jedná vesměs o špatně složené proteiny. Tato metoda proto nebyla použita pro renaturaci a získání dimerního mNKR-P1C izotypu 1.

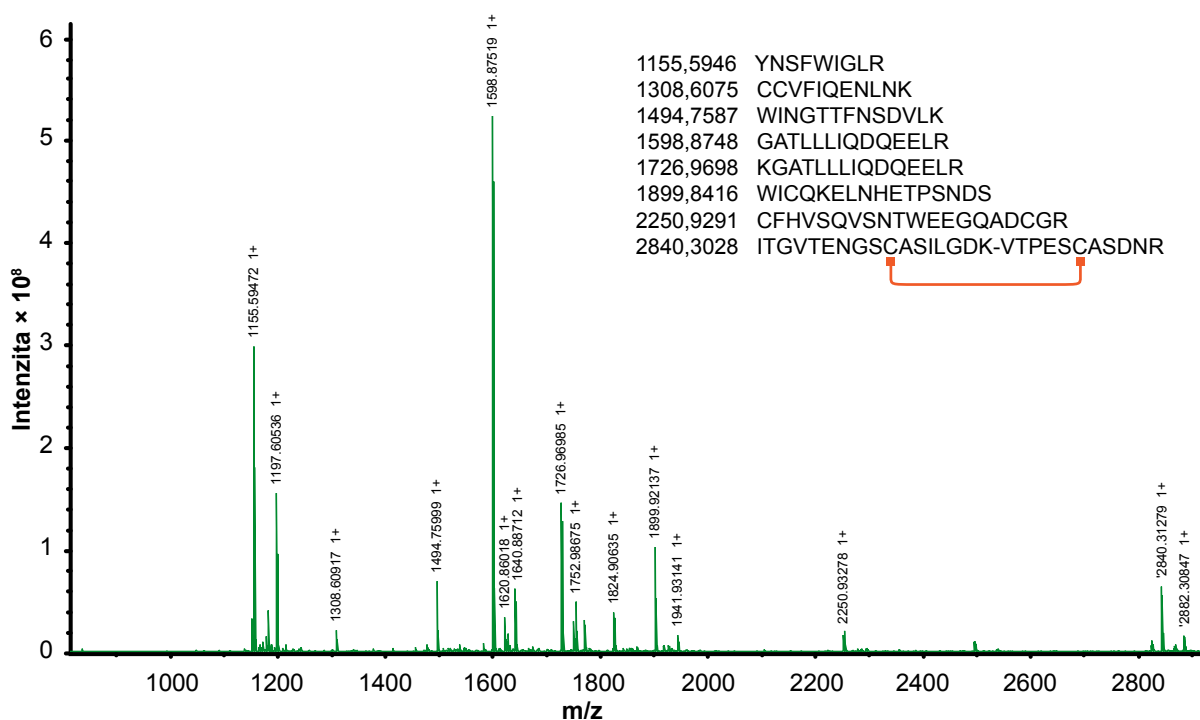


Obrázek 5-20: Analýza frakcí získaných separací na Q-Sepharose. Názvy drah odpovídají frakcím vyznačeným na obrázku 5-19.

5.6. STANOVENÍ DISULFIDOVÝCH VAZEB V REKOMBINANTNÍCH PROTEINECH

Disulfidové můstky jsou důležitou součástí terciární a kvartérní struktury proteinů, neboť tyto strukturu pomáhají stabilizovat. Vytváří se mezi dvěma cysteiny oxidací jejich thio skupin, jež jsou v dostatečné vzdálenosti od sebe. Vzniklé, kovalentně vázané cysteiny se také nazývají jako cystin.

V prvním kroku byla směs získaných a odsolených peptidů analyzována metodou MALDI (kapitola 4.7.3), díky které byly stanoveny fingerprinty všech tří proteinů. Na *obrázku 5-21* na straně 68 je pro ilustraci vyobrazen jeden takový fingerprint proteinu mNKR-P1C izotypu 2 štěpeného trypsinem s přiřazenými aminokyselinovými sekvencemi k nejvýznamnějším píkům v pravém horním rohu. Ve spektru jsou viditelné jak disulfidicky vázané peptidy (m/z 2840,3028 a 1308,6075), tak peptidy s volnými cysteiny (m/z 1899,8416 a 2250,9291). Toto je způsobeno částečnou fragmentací



Obrázek 5-21: Hmotnostní spektrum trypsinových štěpů mNKR-P1C izotypu 2 získané technikou MALDI-FT-ICR. V pravém horním rohu jsou některým píkům přiřazeny odpovídající části sekvence proteinu.

cystických peptidů při MALDI ionizaci [82]. Z tohoto důvodu je tato metoda nevhodná pro přímé určení zapojení disulfidů a je potřeba použít kapalinovou chromatografii ve spojení s ESI-MS.

V druhém kroku bylo z dat získaných na LC-MS stanoveno zapojení disulfidových můstků. To je schematicky znázorněno na obrázku 5-22 pro všechny tři proteiny, včetně mNKR-P1C izotypu 1, u kterého bylo třeba určit, kam se nejčastěji váže již zmíněný

mNKR-P1A



mNKR-P1C izotyp 1 - s vázaným cysteaminem



mNKR-P1C izotyp 1 - dimer



mNKR-P1C izotyp 2



Obrázek 5-22: Schematické znázornění disulfidových vazeb uvnitř molekul jednotlivých rekombinantních proteinů. Čísla cysteinů odpovídají jejich pořadovým číslům jako aminokyselin v celé sekvenci proteinu. Modrá část vyznačuje extracelulární krček a šedá zbytek molekuly včetně C-lectinové domény.

cysteamin. Jak se potvrdilo, skutečně se jedná o vazbu na Cys⁸⁸, který slouží k dimerizaci mNKR-P1C izotypu 1. Zapojení disulfidových můstků v lektinové doméně všech tří rekombinantních proteinů (oranžová barva) odpovídá zapojení, které již dříve změřil Mgr. Daniel Rozbeský ve své diplomové práci^[83] a které je také predikováno na webu UniProt^[80; 81].

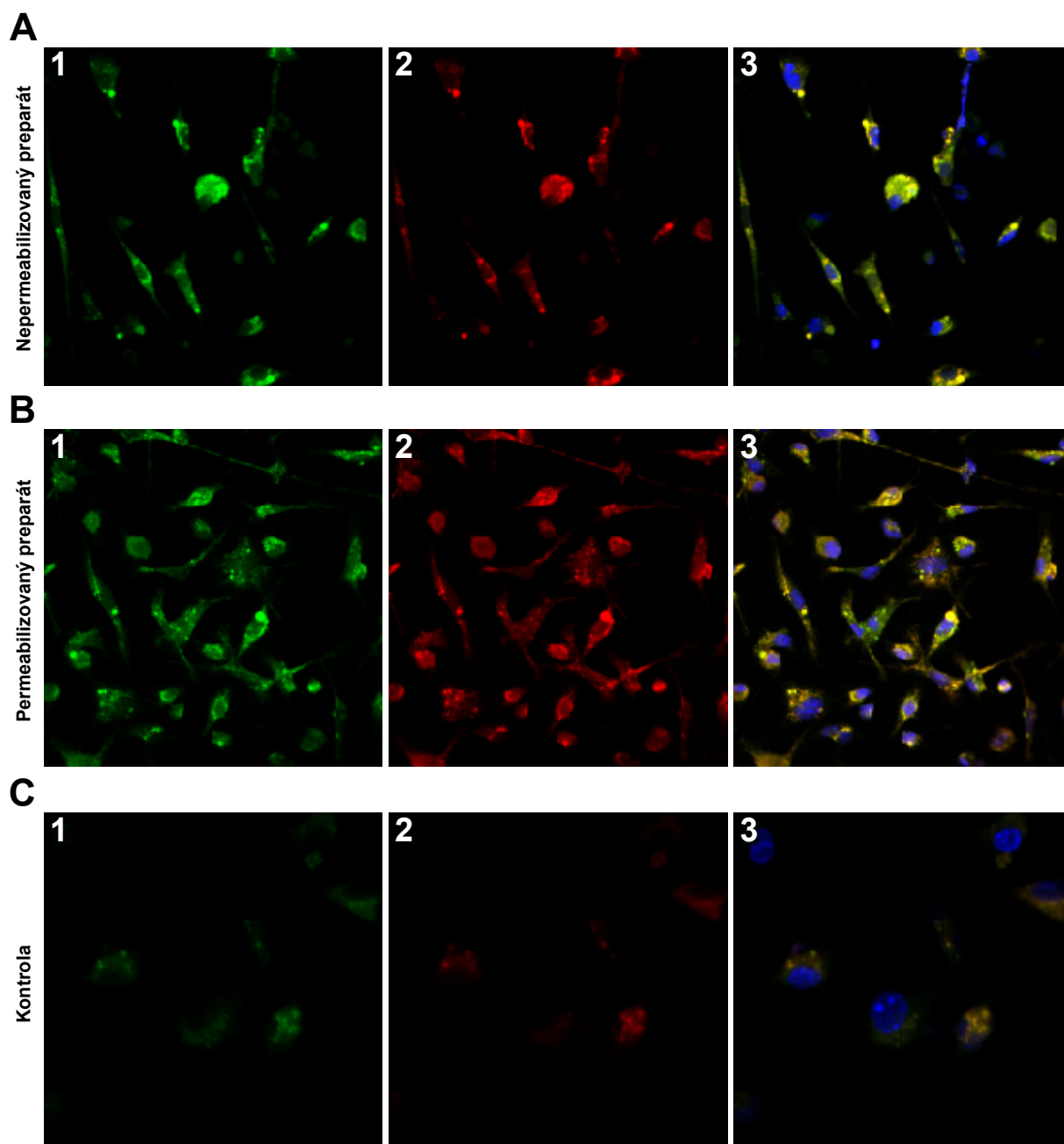
5.7. ZNAČENÍ BUNĚK REKOMBINANTNÍMI PROTEINY S FLUORESCENČNÍ ZNAČKOU

Rekombinantní proteiny, jejichž příprava je popsána v této diplomové práci, mají pochopitelně sloužit k dalším výzkumným účelům. Jedním z nich je hledání jejich ligandu. Ačkoli jeho samotná identifikace nebyla v rámci této práce provedena, byl uskutečněn screening vazby rekombinantních proteinů na heterogenní buněčnou populaci z kostní dřeně myši C57BL/6. Tento screening měl ukázat, jestli je potenciální ligand přítomen na povrchu, či uvnitř *běžných* buněk.

Značení bylo provedeno tak, jak je uvedeno v kapitole 4.8 s tím, že mNKR-P1A byl naznačen fluorescenčním barvivem Alexa Fluor 488 a mNKR-P1C izotyp 1 a 2 barvivem Alexa Fluor 568. Rekombinantní protein mNKR-P1C izotyp 2 se však nepodařilo naznačit.

Na *obrázku 5-23* na straně 70 jsou v řadách vyobrazeny vždy tři snímky jednoho preparátu. V řadě je vždy vyobrazen jako první (1) zelený snímek určující na preparátu lokalizaci mNKR-P1A, jako druhý (2) červený snímek, určující lokalizaci mNKR-P1C izotypu 1 a jako třetí (3) je vyobrazen překryvný snímek ilustrující kolokalizaci obou rekombinantních fluorescenčně značených proteinů. Modře jsou na tomto třetím snímku vyobrazena jádra obarvená fluorescenčním barvivem DAPI. Vzhledem ke kontrole (*obrázek 5-23A1, 2 a 3*) je zřejmá přítomnost fluorescenčně značených rekombinantních proteinů v preparátech na ostatních snímcích (*obrázek 5-23B, C a D*, všechny snímky). Je velmi zajímavé, že oba tyto značené proteiny se nejspíše váží na stejná místa (antigeny) a silně kolokalizují. Na snímcích označených „3“ se tak objevuje takřka pouze žlutá, která vzniká překryvem červeného a zeleného snímku. Mezi permeabilizovanými a nepermeabilizovanými buněčnými preparáty není z hlediska míry fluorescence prakticky žádný rozdíl, což napovídá, že potenciální ligand je extracelulární. Poměrně velká je míra autofluorescence, ale rozdíl mezi značeným a kontrolním preparátem je zatelný. Jádra (*obrázek 5-23* na straně 70, snímky označené „3“, modrá barva)

nevykazují žádné morfologické abnormality a v době fixace se tedy jednalo převážně o živé buňky bez známek apoptózy.



Obrázek 5-23: Snímky buněčných preparátů značených fluorescenčně značenými rekombinantními proteiny mNKR-P1A a mNKR-P1C izotypem 1. Série A zobrazuje značení nepermeabilizovaných buněk, série B značení permeabilizovaných buněk a série C kontrolní preparát bez přítomnosti rekombinantních proteinů, tedy autofluorescenci. Snímky „1“ zobrazují zelenou fluorescenci (mNKR-P1A), „2“ červenou fluorescenci (mNKR-P1C izotyp 1) a „3“ kolokalizaci předchozích dvou (1 a 2).

6. DISKUZE

Přestože bylo členů receptorové rodiny NKR-P1 popsáno již několik a jsou známy mnoho let, doposud nebyla rozřešena kompletní struktura žádného z nich. První krok k rozřešení struktury těchto proteinů podnikl v rámci své diplomové práce^[83] člen naší laboratoře Mgr. Daniel Rozbeský ve spolupráci s Ing. Petrem Kolenkem, PhD. Podařilo se jim získat krystaly lektinové domény (Ser⁸⁹ – His²²⁷) myšího mNKR-P1A (B6) a pomocí rentgenové strukturní analýzy vyřešili strukturu této domény až do rozlišení 1,7 Å^[66]. Ukázalo se, že struktura je velmi podobná lidskému hCD69. Rozdíl oproti struktuře hCD69 je však u mNKR-P1A v oblasti Tyr¹⁵⁹ – Asp¹⁸⁷, jež se vyznačuje chlopní, která směřuje od zbytku molekuly, zatímco analogická struktura u hCD69 je stočena k molekule. Zda je tento rozdíl v jinak velmi podobných strukturách těchto dvou receptorů (viz. *obrázek 1-8* na straně 21) způsoben artefakty vzniklými při krystalizaci, nebo se jedná o specifickou vlastnost struktury mNKR-P1A (či celé rodiny) zůstávalo nejasné. Další experimenty však ukázaly, že v roztoku je smyčka naopak stočena k doméně. Tento rozdíl může být dán specifickými podmínkami při krystalizaci, nebo změnami konformace při vazbě ligandu, protože v krystalu sloužila chlopeň k interakci s vedlejší molekulou^[67].

Ačkoli je rozřešení struktury lektinové domény mNKR-P1A bezesporu úspěch, byla publikována studie^[84], která popisuje odlišné konformace vazebné domény receptoru Ly49 v případech, kdy byl tento receptor připraven s extracelulárním krčkem a bez něho. Autoři popisují jeho možnou *cis* a *trans* vazebnou aktivitu, která je závislá právě na krčku, který tak neslouží pouze ke spojení domény s transmembránovou a intracelulární částí, ale i jako důležitý prvek umožňující tyto změny konformace.

Na základě uvedených skutečností bylo záměrem této diplomové práce připravit celé extracelulární části myších proteinů mNKR-P1A a mNKR-P1C v bakteriích, jejich správná renaturace a určení základních strukturních rysů (disulfidové můstky). V konečném důsledku by se tak porovnáním struktur krátkých a dlouhých konstruktů mNKR-P1A a mNKR-P1C měla dát potvrdit, či vyvrátit situace, která byla popsána u zmíněného receptoru Ly49. Jednou ze stěžejních otázek rovněž bylo, zda produkované rekombinantní proteiny tvoří kovalentní dimery (popř. multimery) skrze krčky, protože samotná lektinová doména byla získána pouze jako monomer.

Mediátorová RNA proteinů byla získána ze slezin myšího kmene C57BL/6, přepsána do cDNA, následně amplifikována metodou PCR a zaklonována do klonovacího vektoru

TOPO, ze kterého byla sekvence přenesena do produkčního vektoru pET-30a(+). I když původním záměrem bylo získání pouze dvou konstruktů a to sice mNKR-P1A a mNKR-P1C izotypu 1, byla díky použitým primerům, kterými není možné rozlišit sekvenci dvou izotypů mNKR-P1C získána i druhá izoforma tohoto proteinu. Obě dvě izoformy se liší o tři aminokyseliny, z nichž jednou je cystein (Cys⁸⁸). U izoformy 1 bylo předem jasné, že její nepárový cystein (Cys⁸⁸) se nemůže párovat intramolekulárně a musí proto buď zůstat v redukovaném stavu, či být zapojen ve vazbě například s druhou molekulou a tvořit tak homodimer. Srovnání obou izoform z hlediska struktury tak může být v budoucím výzkumu přínosné, jelikož se jedná o „přírodní mutaci“. Produkce rekombinantních proteinů probíhala po transformaci bakteriálního kmene *E. coli* BL21-Gold (DE3) produkčním vektorem pET-30a(+) podle předpokladu do inkluzních tělísek, které byly z bakterií následně bez obtíží izolovány.

Renaturace proteinů metodou rychlého naředění za přítomnosti 1 M L-argininu a redoxního systému cysteamin-cystamin byla optimalizována při čtyřech podmínkách (tabulka 4-6 na straně 37) a probíhala bez výrazných problémů, stejně jako následná purifikace na kolonách Q-Sepharosy a Superdexu 75 HR 10/300. Ve všech čtyřech renaturačních roztocích byly jednotlivé rekombinantní proteiny renaturovány s takřka stejnou účinností. Byly však pozorovány rozdíly mezi účinností renaturace mNKR-P1A a mNKR-P1C. Oba izotypy mNKR-P1C se vyznačovaly větší mírou tvorby špatně složených molekul. I přesto bylo dosaženo velký výtěžků, které činily asi 12 mg mNKR-P1A a 8 mg mNKR-P1C (obou izotypů) na jeden litr produkčního média. Při následné analýze však vyšlo najevo, že oba dva izotypy mNKR-P1C jsou monomerní formy.

Dalším krokem tak byla analýza čistých proteinových preparátů na hmotnostním spektrometru metodou ESI-FT-ICR. Hmotnosti mNKR-P1A i mNKR-P1C izotypu 2 přesně souhlasily s teoreticky předpovězenými, avšak mNKR-P1C izotyp 1 se experimentálně a teoretickou hmotností lišil o desítky kilodaltonů. Bylo tak přistoupeno u všech tří rekombinantních proteinů k redukci činidlem TCEP. U mNKR-P1A a mNKR-P1C izotypu 2 se touto redukcí zvýšila hmotnost přesně o 8 vodíkových atomů, což odpovídá zapojení všech cysteinů do intramolekulárních disulfidových vazeb. Redukcí mNKR-P1C izotypu 1 ale došlo k výraznému snížení hmotnosti. Jak bylo následně zjištěno, tento rozdíl hmotností odpovídá hmotnosti cysteaminu, jednoho z partnerů tvořících redoxní systém v renaturačních roztocích. Analýzou disulfidových můstků molekuly mNKR-P1C izotypu 1 modifikované cysteaminem bylo prokázáno, že cysteamin se váže na Cys⁸⁸. Bylo proto nutné metodu renaturace tohoto izotypu modifikovat tak, aby k vazbě

nedocházelo, nebo se podařilo získat alespoň dostatečně velké množství nemodifikované formy.

Prvním logickým krokem tak byla optimalizace koncentrací cysteaminu a cystaminu v renaturačních roztocích, včetně renaturace v roztoku s úplnou absencí redoxního systému. Výsledky však nepřinesly požadovaný efekt a spíše docházelo k markantnímu poklesu účinnosti renaturace, přičemž v roztocích obsahujících redoxní systém i nadále docházelo k modifikaci Cys⁸⁸ cysteaminem a v roztoku bez redoxního systému prakticky všechen protein přešel do formy agregátů. Pouhou optimalizací koncentrace partnerů redoxního systému tak nelze získat mNKR-P1C izotyp 1 bez modifikace cysteaminem.

Následně proto byly navrhnuty tři další úpravy renaturačního protokolu. První byla změna redoxního systému na redukovaný a oxidovaný glutathion, která sice zvýšila výtěžek správně složeného rekombinantního proteinu při renaturaci, ale opět docházelo k modifikaci Cys⁸⁸ tentokrát glutathionem. Druhou úpravou byla renaturace v 10% glycerolu, která měla za cíl snížit flexibilitu krčku tohoto proteinu zvýšením viskozity renaturačního roztoku. Krček totiž zřejmě nezaujímá rigidní konformaci vůči doméně a může se tak volně pohybovat. Nedochází proto nejspíše tak často k efektivnímu přiblížení Cys⁸⁸ ke svému vazebnému partnerovi, což jej činí náchylnější k modifikaci. Tato druhá úprava nezaznamenala výraznějších účinků při renaturaci s glutathionem, ale při renaturaci s cysteaminem a cystaminem již docházelo ke vzniku dimerního mNKR-P1C izotypu 1. Třetí úpravou renaturačních podmínek, která se nakonec ukázala být nejefektivnější, byla renaturace tohoto proteinu v renaturačním roztoku bez redoxního systému, který byl však následně přidán, aby usnadnil vznik disulfidových vazeb. Tato třetí úprava se ukázala být srovnatelně účinnou jak v roztoku bez glycerolu, tak s ním. Z celkové frakce správně složeného mNKR-P1C izotypu 1 z Q-Sepharosy bylo možno získat následnou separací na Superdexu 75 HR 10/300 asi 30 – 40 % tohoto proteinu ve formě dimeru, což odpovídá výtěžku 1 – 2 mg dimeru z litru produkčního média. Ani na této koloně však nebylo možné dimer zcela vypurifikovat. Byl slabě kontaminován monomerní formou modifikovanou cysteaminem. Důvodem, proč nebyla takto rozsáhlá optimalizace renaturace provedena i s glutathionem, který jevil dobré výsledky renaturace, je jeho značně vyšší finanční náročnost oproti cysteaminu a cystaminu.

I tento dimerní mNKR-P1C izotyp 1 byl podroben analýze na hmotnostním spektrometru metodou ESI-FT-ICR. V naměřeném hmotnostním spektru na *obrázku 5-17* na straně 65 je možné rozeznat píky odpovídající třem formám mNKR-P1C izotypu 1. Tyto píky odpovídají dimerní formě tohoto rekombinantního proteinu a

dvěma druhům monomeru. Jedním z monomerů je cysteaminem modifikovaná forma proteinu (kontaminující) a druhým je monomer vzniklý rozštěpením dimeru při ionizaci a usměrnění iontů do ICR cely. I přes měkkost použitého ionizačního zdroje totiž může dojít k přerušení této jediné kovalentní vazby párující dvě velké molekuly mNKR-P1C izotypu 1. Důvodem nepoměrné intenzity jednotlivých forem v hmotnostním spektru je použitý hmotnostní spektrometr, který má preferenci k proteinům s nižší hmotností molekuly. Získaná hmotnostní spektra tudíž rozhodně nevypovídají o kvantitě jednotlivých forem v získaném proteinovém preparátu. Důkaz přítomnosti dimerní formy mNKR-P1C izotypu 1 je dobře viditelný na dekonvoluovaném spektru na témže obrázku a jeho hmotnost již odpovídala teoreticky předpovězené. Z následného stanovení zapojení cysteinů v disulfidových můstcích vyšlo jasně najevo, že Cys⁸⁸ skutečně slouží k párování s Cys⁸⁸ druhé molekuly. Tento cystein tudíž s největší pravděpodobností skutečně slouží ke kovalentní dimerizaci mNKR-P1C izotypu 1.

Zůstává otázkou, zdali i mNKR-P1A a mNKR-P1C izotyp 2 vytváří kovalentní dimery tak, jako je pravděpodobně tvoří mNKR-P1C izotyp 1, či jak se všechny zmiňované rekombinantní proteiny vyskytují na povrchu buněk za fyziologických podmínek. Ověření této hypotézy ztěžuje fakt, že pro mNKR-P1A neexistuje specifická protilátka a mNKR-P1C izotyp 2 nelze odlišit od izotypu 1 kvůli pozici tří chybějících aminokyselin u izotypu 2, protože toto místo je pro protilátky špatně dostupné. Pro budoucí výzkum by proto bylo vhodné stanovit pomocí kvantitativní PCR míru zastoupení mRNA pro jednotlivé izoformy. Pokud je jejich poměrné zastoupení dostatečně vyrovnané, bylo by možné provést nativní elektroforézu s buněčným lyzátem a detekovat tyto formy protilátkou PK136 na gelu, kde by se dala přibližně odečíst velikost molekul a z velikosti zón usoudit na příslušný izotyp.

Prvním studií provedenou již na čistých připravených preparátech rekombinantních mNKR-P1A_M, mNKR-P1C_D izotypu 1 a mNKR-P1C_M izotypu 2, bylo stanovení disulfidových můstků v molekulách pomocí štěpení specifickými proteázami (Trypsin, Asp-N, Glu-C) s následnou analýzou na MALDI-FT-ICR (proteinový fingerprint) a LC-MS. Ačkoli disulfidové můstky jevíly ve všech třech rekombinantních proteinech malou míru scramblingu (chaotického zapojení), která je pravděpodobně způsobena nedokonalostí renaturace *in vitro*, bylo možné pozorovat výrazný motiv, který je znázorněn na *obrázku 5-22* na straně 68. Zapojení disulfidových můstků v lektinové doméně odpovídá tomu, jež stanovil ve své diplomové práci Mgr. Daniel Rozbeský^[83], a jež je predikováno na internetové stránce UniProt pro oba proteiny^[80; 81]. S přihlédnutím k těmto faktům lze stanovené zapojení disulfidů označit jako pravděpodobně správné.

Připravené rekombinantní proteiny jsou do budoucna určeny i pro výzkum v oblasti hledání jejich ligandu. Za tímto účelem byly rekombinantní proteiny naznačeny fluorescenčními barvivy *Alexa Fluor*. Naneštěstí se ukázalo, že vlivem metodiky, nebo použitého barviva dochází ke značným ztrátám proteinů. Vzhledem k vysokým nákladům spojeným se značením, nebylo možné značení zopakovat a identifikovat důvod těchto ztrát. Celkově bylo získáno jen asi 10 – 20 % značeného proteinu z původního množství, jež bylo vloženo do reakce, přičemž značený mNKR-P1C izotyp 2 se nepodařilo získat vůbec. Toto malé množství fluorescenčně značených mNKR-P1A a mNKR-P1C izotypu 1 však stačilo pro provedení základních fluorescenčních experimentů. Prvním z nich byl screening vazby na různorodé populace buněk diferencovaných z kostní dřeně myši C57BL/6. Ačkoli se jedná o aktivační receptory a ligand na povrchu běžných buněk nebyl očekáván, ukázalo se, že je přesto na povrchu pravděpodobně přítomen. Jelikož preparáty byly ošetřeny proti nespecifické vazbě proteinem BSA, měla by být nespecifičnost vazby nízká. O to zajímavější je, že mNKR-P1A a mNKR-P1C izotyp 1 na preparátech vazebně kolokalizují (*obrázek 5-23* na straně 70). Proto prozatím zůstává nezodpovězenou otázkou, jestli sdílí stejný ligand podobně jako NKR-P1B a NKR-P1D^[61], nebo se jedná pouze o artefakty.

Získané extracelulární části rekombinantních proteinů mNKR-P1A a obou izotypů mNKR-P1C budou v následném výzkumu použity k dalším experimentům. Jelikož znalost trojrozměrné struktury proteinu je jedním z předpokladů k určení jejich funkce, bude velmi důležité rozřešit tuto jejich strukturu a porovnat ji s kratšími konstrukty. Důraz bude kladen i na hledání ligandů těchto tří proteinů, jež by rozšířily poznatky o NK buněčném rozpoznávání.

7. SOUHRN

- Byly připraveny produkční vektory pET-30a-(+) nesoucí extracelulární kódující sekvence mNKR-P1A a obou izotypů mNKR-P1C.
- Byly nalezeny vhodné podmínky renaturace mNKR-P1A a mNKR-P1C izotypu 2 a rovněž byla vyvinuta metoda renaturace mNKR-P1C izotypu 1 jako dimerní formy.
- Na hmotnostním spektrometru byly stanoveny přesné hmotnosti purifikovaných proteinů, které přesně odpovídají teoreticky předpovězeným.
- Byly stanoveny disulfidové můstky ve všech třech rekombinantních proteinech metodou LC-MS.
- Rekombinantní proteiny mNKR-P1A a mNKR-P1C izotyp 1 byly chemickou cestou opatřeny fluorescenční značkou.
- Inkubace fluorescenčně značených rekombinantních proteinů s buněčnými preparáty napovídá, že mNKR-P1A a mNKR-P1C izotyp 1 vazebně kolokalizují.

8. CITOVANÁ LITERATURA

- [1] **Abbas, A. K., Lichtman, A. H. a Pillai, S.** *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: Elsevier, 2011. 978-1-4377-1528-6.
- [2] **Kiessling, R., Klein, E. a Wigzell, H.** „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*. 1975, Sv. 5, stránky 112-117.
- [3] **Raulet, D. H. a Vance, R. E.** Self-tolerance of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2006, Sv. 6, stránky 520-531.
- [4] **Freud, A. G. a Caligiuri, M. A.** Human natural killer cell development. *Immunol. Rev*. 2006, Sv. 214, stránky 56-72.
- [5] **Trinchieri, G.** Biology of Natural Killer Cells. *Adv. Immunol*. 1989, Sv. 47, stránky 187-376.
- [6] **Yokoyama, W. M.** Natural killer cell receptors. *Curr Opin Immunol*. 1995, Sv. 7, stránky 110-120.
- [7] **Orange, J. S. a Ballas, Z. K.** Natural killer cells in human health and disease. *Clin. Immunol*. 2006, Sv. 118, stránky 1-10.
- [8] **Reyburn, H. T., a další.** The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature*. 1997, Sv. 386, stránky 514-517.
- [9] **Lodoen, M. B. a Lanier, L. L.** Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2005, Sv. 3, stránky 59-69.
- [10] **Bassing, C. H., Swat, W. a Alt, F. W.** The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*. 2002, Sv. 109, stránky 45-55.
- [11] **Vivier, E., a další.** Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol*. 2008, Sv. 9, stránky 503-510.
- [12] **Lanier, L. L.** NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol*. 2005, Sv. 23, stránky 225-274.
- [13] **Kim, S., a další.** In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, Sv. 97, stránky 2731-2736.
- [14] **Haller, O. a Wigzell, H.** Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent. *J Immunol*. 1977, Sv. 118, 4, stránky 1503-1506.
- [15] **Bennett, M., a další.** Analysis of low natural killer cell activity in ⁸⁹Sr-treated mice. *Eur J Immunol*. 1982, Sv. 12, 5, stránky 442-445.
- [16] **Di Santo, J. P.** Natural killer cells: diversity in search of a niche. *Nat Immunol*. 2008, Sv. 9, stránky 473-475.
- [17] **Di Santo, J. P.** Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol*. 2006, Sv. 24, stránky 257-286.
- [18] **Yokoyama, W. M., a další.** In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol*. 2002, Sv. 3, 6, stránky 523-528.
- [19] **Suzuki, H., a další.** Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor β chain. *J Exp Med*. 1997, Sv. 185, stránky 499-505.
- [20] **Rosmaraki, E. E., a další.** Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol*. 2001, Sv. 31, stránky 1900-1909.
- [21] **Rankin, L. a Belz, G. T.** Diverse roles of inhibitor of differentiation 2 in adaptive immunity. *Clin Dev Immunol*. 2011, Sv. 2011, stránky 1-11.
- [22] **Ikawa, T., a další.** Long-term cultured E2A-deficient hematopoietic progenitor cells are pluripotent. *Immunity*. 2004, Sv. 20, stránky 349-360.
- [23] **Ikawa, T., a další.** Commitment of Common T/Natural Killer (Nk) Progenitors to Unipotent T and Nk Progenitors in the Murine Fetal Thymus Revealed by a Single Progenitor Assay. *J Exp Med*. 1999, Sv. 190, stránky 1617-1626.
- [24] **Samson, S. I., a další.** GATA-3 Promotes Maturation, IFN- γ Production, and Liver-Specific Homing of NK Cells. *Immunity*. 2003, Sv. 19, stránky 701-711.
- [25] **Braunstein, M. a Anderson, M. K.** HEB-deficient T-cell precursors lose T-cell potential and adopt an alternative pathway of differentiation. *Mol Cell Biol*. 2011, Sv. 31, stránky 971-982.
- [26] **Farag, S. S. a Caligiuri, M. A.** Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*. 2006, Sv. 20, stránky 123-137.
- [27] **Colucci, F., Caligiuri, M. A. a Di Santo, J. P.** What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*. 2003, Sv. 3, stránky 413-425.
- [28] **Freud, A. G., a další.** Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*. 2006, Sv. 194, stránky 1033-1043.
- [29] **Townsend, M. J., a další.** T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity*. 2004, Sv. 20, stránky 477-494.
- [30] **Cooper, M. A., Fehniger, T. A. a Caligiuri, M. A.** The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001, Sv. 22, stránky 633-640.
- [31] **Lanier, L. L., a další.** The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK

- cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986, Sv. 136, stránky 4480-4486.
- [32] **Orr, M. T., Murphy, W. J. a Lanier, L. L.** 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol.* 2010, Sv. 11, stránky 321-327.
- [33] **Cruz-Munoz, M. E. a Veillette, A.** Do NK cells always need a license to kill? *Nat Immunol.* 2010, Sv. 11, stránky 279-280.
- [34] **Kim, S., a další.** Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* 2005, Sv. 436, stránky 709-713.
- [35] **Fernandez, N. C., a další.** A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood.* 2005, Sv. 105, stránky 4416-4423.
- [36] **Yokoyama, W. M. a Kim, S.** Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev.* 2006, Sv. 214, stránky 143-154.
- [37] **Sun, J. C. a Lanier, L. L.** Cutting Edge: Viral Infection Breaks NK Cell Tolerance to "Missing Self". *J Immunol.* 2008, Sv. 181, stránky 7453-7457.
- [38] **Quan, F. S., a další.** Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *J Virol.* 2007, Sv. 81, stránky 3514-3524.
- [39] **O'Leary, J. G., a další.** T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol.* 2006, Sv. 7, 5, stránky 507-516.
- [40] **Sun, J. C., Beilke, J. N. a Lanier, L. L.** Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature.* 2009, Sv. 457, stránky 557-561.
- [41] **Paust, S. a von Adrian, U. H.** Natural killer cell memory. *Nat Immunol.* 2011, Sv. 12, 6, stránky 500-508.
- [42] **Björkström, N. K., a další.** Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med.* 2011, Sv. 208, stránky 13-21.
- [43] **Paust, S., a další.** Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat Immunol.* 2010, Sv. 11, stránky 1127-1135.
- [44] **Bajénoff, M., a další.** Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med.* 2006, Sv. 203, stránky 619-631.
- [45] **Farag, S. S., a další.** Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol.* 2003, Sv. 78, stránky 7-17.
- [46] **Ferlazzo, G., a další.** The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol.* 2004, Sv. 172, stránky 1455-1462.
- [47] **Smyth, M. J., a další.** Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2005, Sv. 42, stránky 501-510.
- [48] **Perussia, B., Chen, Y. a Loza, M. J.** Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. *Mol Immunol.* 2005, Sv. 42, stránky 385-395.
- [49] **Hao, L., Klein, J. a Nei, M.** Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, Sv. 103, stránky 3192-3197.
- [50] **Martin, A. M., a další.** Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. *Trends Immunol.* 2002, Sv. 23, stránky 81-88.
- [51] **Lanier, L. L.** Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2008, Sv. 9, stránky 495-502.
- [52] **Orihuela, M., Margulies, D. H. a Yokoyama, W. M.** The natural killer cell receptor Ly-49A recognizes a peptide-induced conformational determinant on its major histocompatibility complex class I ligand. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996, Sv. 93, stránky 11792-11797.
- [53] **George, T. C., a další.** Tolerance and alloreactivity of the Ly49D subset of murine NK cells. *J Immunol.* 1999, Sv. 163, stránky 1859-1867.
- [54] **Yen, J. H., a další.** Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 2001, Sv. 193, stránky 1159-1168.
- [55] **Suzuki, Y., a další.** Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2004, Sv. 122, stránky 1133-1136.
- [56] **Shum, B. P., a další.** Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. *J Immunol.* 2002, Sv. 168, stránky 240-252.
- [57] **Braud, V. M., Allan, D. S. a McMichael, A. J.** Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol.* 1999, Sv. 11, stránky 100-108.
- [58] **Michaelsson, J., a další.** A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med.* 2002, Sv. 196, stránky 1403-1414.
- [59] **Raulet, D. H.** Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligand. *Nat Rev Immunol.* 2003, Sv. 3, stránky 781-790.
- [60] **Bahram, S., a další.** A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994, Sv. 91, stránky 6259-6263.
- [61] **Carlyle, J. R., a další.** Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1

- alloreactivity of mouse NK cells. *J Immunol.* 2006, Sv. 176, stránky 7511-7524.
- [62] **Lanier, L. L., Chang, C. a Phillips, J. H.** Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol.* 1994, Sv. 153, stránky 2417-2428.
- [63] **Bezouška, K., a další.** Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity. *Nature.* 1994, Sv. 372, stránky 150-157.
- [64] **Krist, P., a další.** Toward an optimal oligosaccharide ligand for rat natural killer cell activation receptor NKR-P1. *Biochem Bioph Res Co.* 2001, Sv. 287, stránky 11-20.
- [65] **Aldemir, H., a další.** Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol.* 2005, Sv. 176, stránky 7791-7795.
- [66] **Kolenko, P., a další.** Molecular architecture of mouse activating NKR-P1 receptors. *J Struct Biol.* 2011, Sv. 175, stránky 434-441.
- [67] **Rozbeský, D., a další.** Chemical cross-linking and H/D exchange for fast refinement of protein crystal structure. *Anal Chem.* 2012, Sv. 84, stránky 867-870.
- [68] **Arase, N., a další.** Association with FcRγ is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. *J Exp Med.* 1997, Sv. 186, stránky 1957-1963.
- [69] **Pozo, D., a další.** CD161 (human NKR-P1A) signaling in NK cells involves the activation of acid sphingomyelinase. *J Immunol.* 2006, Sv. 176, stránky 2397-2406.
- [70] **Carlyle, J. R., a další.** Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function. *J Immunol.* 1999, Sv. 162, stránky 5917-5923.
- [71] **Carlyle, J. R., a další.** Missing self-recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004, Sv. 101, stránky 3527-3532.
- [72] **Voigt, S., a další.** Cytomegalovirus evasion of innate immunity subversion of the NKR-P1B:Clr-b missing-self axis. *Immunity.* 2007, Sv. 26, stránky 617-627.
- [73] **Brumbaugh, K. M., a další.** Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *J Exp Med.* 1997, Sv. 186, stránky 1965-1974.
- [74] **Kveberg, L., a další.** Phylogenetic and functional conservation of the NKR-P1F and NKR-P1G receptors in rat and mouse. *Immunogenetics.* 2010, Sv. 63, stránky 429-436.
- [75] **Iizuka, K., a další.** Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR-P1 family of natural killer cell receptors. *Nat Immunol.* 2003, Sv. 4, stránky 801-807.
- [76] **Sambrook, J., Fritsch, E. F. a Maniatis, T.** *Molecular Cloning, a Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [77] **Wei, Ch., a další.** Oxidative refolding of recombinant prochymosin. *Biochem. J.* 1999, Sv. 340, stránky 345-351.
- [78] **Senko, M. W., Beu, S. C. a McLafferty, F. W.** Determination of monoisotopic masses and ion populations for large biomolecules from resolved isotopic distributions. *J Am Soc Mass Spectr.* 1995, Sv. 6, stránky 229-233.
- [79] **Young, M. M., a další.** High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *P Natl Acad Sci USA.* 2000, Sv. 97, stránky 5802-5806.
- [80] **Webová stránka proteinu mNKR-P1A.** *Web UniProt.* [Online] [Citace: 7. Červenec 2010.] <http://www.uniprot.org/uniprot/P27811>.
- [81] **Webová stránka proteinu mNKR-P1C.** *Web UniProt.* [Online] [Citace: 7. Červenec 2010.] <http://www.uniprot.org/uniprot/P27814>.
- [82] **Patterson, S. D. a Katta, V.** Prompt fragmentation of disulfide-linked peptides during matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 1994, Sv. 66, stránky 3727-3732.
- [83] **Rozbeský, Daniel.** Rekombinantní exprese a studium receptorů mNKR-P1A a C. *Diplomová práce.* Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2009.
- [84] **Back, J., a další.** Distinct conformations of Ly49 natural killer cell receptors mediate MHC class I recognition in trans and cis. *Immunity.* 2009, Sv. 31, stránky 598-608.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka