

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Obor: Imunologie



**Studium interakce lektinových receptorů přirozených
zabíječů s jejich proteinovými ligandy**

**Studies on interactions between natural killer cell
lectin receptors and their protein ligands**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Hynek Mrázek, Ph.D.

PRAHA, 2014

LUCIE HERNYCHOVÁ

Prohlášení:

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

V Praze, 2. 5. 2014

.....
LUCIE HERNYCHOVÁ

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. a RNDr. Hynku Mrázkovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za navržení experimentálního designu, za ochotu podělit se o své cenné zkušenosti a kdykoliv řešit veškeré překážky s tím spojené.

Poděkování patří také všem členům laboratoře Strukturní biologie a buněčné signalizace, kteří podporují a motivují studenty, jsou skvělým kolektivem a vytváří tak přátelské pracovní prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat těm, kteří se na této práci podíleli. Mgr. Zdeňku Kukačkovi za vytvoření modelů proteinů. Mgr. Valérii Grobárové, Ph.D., Doc. RNDr. Janu Černému, Ph.D., Mgr. Ondřeji Šebestovi a Janě Dvořákové za pomoc s biologickými testy interakce fluorescenčně značeného rekombinantního proteinu s buněčnými preparáty. A dále Mgr. Ladislavu Bumbovi, Ph.D. za testování interakce proteinů povrchovou plazmonovou resonancí.

Velký dík patří také mé rodině a přátelům za podporu během celého studia.

ABSTRAKT

NK buňky jsou přirozené lymfocyty, které tvoří díky svému receptorovému systému první linii obrany organismu před infekcemi. Jsou důležitou součástí protivirové, ale také protinádorové imunity, hrají roli v transplantační imunitě, autoimunitě nebo reprodukci. Tato diplomová práce se zabývá studiem struktury membránového receptoru NKR-P1B myších NK buněk a jeho interakcí s ligandem Clr-b.

Cílem bylo připravit expresní vektor kódující ligand-vazebnou a celou extracelulární část receptoru NKR-P1B a optimalizovat jeho produkci a renaturaci *in vitro*. Připravené proteiny byly analyzovány gelovou filtrací, elektroforeticky a hmotnostní spektrometrií. Poté byla sledována jejich interakce s proteinem Clr-b biofyzikálními (gelová filtrace a povrchová plazmonová rezonance) a biologickými metodami (značení buněčných preparátů proteiny NKR-P1B s navázanou fluorescenční sondou). *In vitro* vazebné pokusy nepotvrdily vzájemnou interakci NKR-P1B a Clr-b, přestože se připravené proteiny vázaly na buňky z kostní dřeně.

Klíčová slova: *NK buňka, NKR-P1 receptory, proteiny Clr, renaturace proteinů, hmotnostní spektrometrie, disulfidické můstky, chemické zesílení, fluorescenční značení*

ABSTRACT

NK cells are innate lymphocytes which constitute the first line of organism's defence against infections through their receptor system. These cells represent an important part of antiviral and antitumor immunity, they also play a role in transplant immunity, autoimmunity and reproduction. This diploma thesis inquires into the structure of the transmembrane receptor NKR-P1B of mouse NK cells and the interaction with its ligand Clr-b.

The aim was to prepare the expression vector coding the ligand-binding and whole extracellular region of the receptor NKR-P1B and to optimize its production and refolding *in vitro*. Purified protein samples were analyzed by size-exclusion chromatography, electrophoresis and mass spectrometry. Interaction between NKR-P1B and Clr-b proteins was tested using biophysical (size-exclusion chromatography and surface plasmon resonance) and biological methods (labelling of cellular sample with NKR-P1B proteins marked with fluorescent dye). *In vitro* binding experiments have not confirmed mutual interaction between NKR-P1B and Clr-b despite the prepared proteins binding to the bone marrow cells.

Key words: *NK cell, NKR-P1 receptors, Clr proteins, protein refolding, mass spectrometry, disulfide bonds, chemical cross-linking, fluorescent labelling*

OBSAH

1	Literární úvod.....	12
1.1	Pozice NK buněk v rámci imunitního systému	12
1.2	Vývoj, typy a anatomická lokalizace NK buněk	13
1.3	Principy aktivace NK buněk	16
1.4	Funkce NK buněk	17
1.4.1	Cytotoxická aktivita	18
1.4.2	Regulace imunitní odpovědi NK buňkami	21
1.4.3	Další funkce NK buněk	21
1.5	NK-buněčná signalizace	24
1.5.1	Signalizace zprostředkovaná aktivačními receptory	24
1.5.2	Signalizace zprostředkovaná inhibičními receptory	25
1.6	NK receptory	25
1.6.1	Imunoglobulinové receptory.....	25
1.6.2	C-lektinové receptory	27
2	Cíle práce.....	32
3	Materiál	33
3.1	Přístroje	33
3.2	Chromatografické kolony.....	34
3.3	Kity	34
3.4	Chemikálie	34
3.5	Enzymy.....	36
3.6	Inhibitory proteáz.....	37
3.7	Primery pro PCR.....	37
3.8	Vektory.....	37
3.9	Bakteriální kmeny.....	37
3.10	Média.....	37
3.11	Roztoky a pufry	37
4	Metody	40
4.1	Příprava konstruktů kódujících NKR-P1B	40
4.1.1	Polymerázová řetězová reakce	40
4.1.2	Příprava a ligace amplifikovaného genu do expresního vektoru	41
4.2	Příprava kompetentních buněk	44

4.3	Rekombinantní exprese proteinů	44
4.3.1	Transformace produkčních kompetentních buněk.....	45
4.3.2	Selekce produkčního klonu.....	45
4.3.3	Optimalizace produkce proteinů.....	45
4.3.4	Produkce proteinů ve velkém objemu média	46
4.3.5	Izolace inkluzních tělísek	46
4.3.6	Solubilizace inkluzních tělísek.....	47
4.4	Renaturace proteinů.....	47
4.4.1	Optimalizace renaturace proteinů NKR-P1B.....	48
4.4.2	Velkoobjemová renaturace proteinů.....	49
4.5	Metody pro zakoncentrování roztoku proteinu.....	49
4.5.1	Ultrafiltrace.....	49
4.5.2	Centrifugační koncentrátoři	49
4.6	Gelová filtrace	49
4.7	Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové.....	50
4.8	Elektromigrační metody.....	50
4.8.1	DNA elektroforéza v agarózovém gelu	50
4.8.2	Diskontinuální SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	51
4.9	Hmotnostní spektrometrie.....	53
4.9.1	Odsolení proteinu a stanovení jeho molekulové hmotnosti	54
4.9.2	Identifikace disulfidických můstků v proteinech	55
4.9.3	Chemické zesítnění proteinů NKR-P1B	56
4.9.4	Model proteinů NKR-P1B.....	59
4.10	Biochemické metody testování interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b.....	59
4.10.1	Gelová filtrace	59
4.10.2	Povrchová plazmonová rezonance.....	60
4.11	Biologické metody testování interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b.....	60
4.11.1	Fluorescenční značení proteinů NKR-P1B.....	61
4.11.2	Příprava a značení tkáňových řezů rekombinantními proteiny NKR-P1B s fluorescenční sondou	61
4.11.3	Příprava a značení buněk kostní dřeně rekombinantními proteiny NKR-P1B s fluorescenční sondou	62

5	Výsledky	63
5.1	Úvod k výsledkům.....	63
5.2	Příprava konstruktů kódujících NKR-P1B	64
5.3	Expres rekombinantních proteinů NKR-P1B.....	66
5.3.1	Transformace produkčních buněk a selekce produkčních klonů.....	66
5.3.2	Optimalizace produkce proteinů NKR-P1B.....	67
5.4	Renaturace rekombinantních proteinů.....	69
5.4.1	Optimalizace renaturace proteinů.....	69
5.4.2	Velkoobjemová renaturace a purifikace proteinů	71
5.5	Stanovení koncentrace proteinů a celkového výtěžku	73
5.6	Ověření identity proteinů NKR-P1B	74
5.6.1	Přesná molekulová hmotnost proteinů.....	74
5.7	Struktura proteinů NKR-P1B.....	75
5.7.1	Identifikace disulfidických vazeb	75
5.7.2	Chemické zesítnění proteinů NKR-P1B	78
5.7.3	Modely proteinů	80
5.8	Interakce NKR-P1B a Clr-b testovaná biofyzikálními metodami.....	81
5.8.1	Gelová filtrace	81
5.8.2	Povrchová plazmonová rezonance.....	83
5.9	Interakce NKR-P1B a Clr-b testovaná biologickými metodami.....	83
5.9.1	Tkáňové řezy.....	83
5.9.2	Buňky kostní dřeně.....	83
6	Diskuze	85
7	Souhrn.....	90
8	Citovaná literatura	91
9	Seznam příloh	98

SEZNAM ZKRATEK

AcN	acetonitril
ADCC	na protilátkách závislá cytotoxicita (<i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i>)
AML	akutní myeloidní leukémie (<i>Acute Myeloid Leukemia</i>)
APS	amonium persulfát (peroxodisíran amonný)
B7-H6	nádorový antigen, ligand receptoru NKp30
BAT3	transkript 3 asociovaný s HLA-B (<i>HLA-B Associated Transcript 3</i>)
Bcl-2	regulátor apoptózy (<i>B cell lymphoma 2</i>)
BCR	specifické receptory B lymfocytů (<i>B Cell Receptor</i>)
Bid	pro-apoptotický protein interagující s BH3 doménou (<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>)
CD	diferenční skupina (<i>Cluster of Differentiation</i>)
Clr /CLEC2	protein asociovaný s C-lektiny (<i>C-type lectin related /C-type lectin-like receptor 2</i>)
CMV	cytomegalovirus
CTLD	doména C-lektinového typu (<i>C-Type Lectin-like Domain</i>)
CTLR	C-lektinový receptor (<i>C-Type Lectin-like Receptor</i>)
DC	dendritická buňka (<i>Dendritic Cell</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
dNK	deciduální NK buňka (<i>decidual Natural Killer Cell</i>)
DSG	disukcinimidyl glutarát
DSS	disukcinimidyl suberát
EMCV	<i>Encephalomyocarditis virus</i>
ESI	ionizace elektrosprejem (<i>Electrospray Ionization</i>)
FA	kyselina mravenčí (<i>Formic Acid</i>)
FBS	hovězí sérum pro kultivaci buněk (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>)
G-CSF	granulocyty stimulující růstový faktor (<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>)
GM-CSF	granulocyty a makrofágy stimulující růstový faktor (<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>)
GFP	zelený fluorescenční protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli (<i>Graft versus Host Disease</i>)
H/D výměna	vodík/deuteriová výměna
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová

HLA	lidský leukocytární antigen (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HSPG	proteoglykan heparan sulfát (<i>Heparan Sulfate Proteoglycan</i>)
IFN- γ	interferon gamma
IL-15R	receptor pro interleukin 15
ILC	skupina vrozených lymfocytů (<i>Innate Lymphoid Cells</i>)
iNKT	invariantní NKT buňka (<i>Natural Killer T cell</i>)
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ITAM	aktivační motiv založený na tyrosinu (<i>Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif</i>)
ITIM	inhibiční motiv založený na tyrosinu (<i>Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif</i>)
iTreg	indukované regulační T lymfocyty
KACL	C-lektin asociovaný s keratinocyty (<i>Keratinocyte-Associated C-type Lectin</i>)
KARAP/DAP12	adaptorová molekula nesoucí aktivační motiv ITAM (<i>Killer cell Activating Receptor-Associated Protein/DNAX Activating protein of 12 kDa</i>)
KIR	imunoglobulinové receptory NK buněk (<i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptors</i>)
KIR3DS1	receptor KIR s 3 doménami, krátkým cytoplazmatickým řetězcem, 1
KLR	C-lektinové receptory NK buněk (<i>Killer cell Lectin-like Receptors</i>)
KLRB1	C-lektinové receptory NK buněk, podrodina B, člen 1 (<i>Killer cell Lectin-like Receptor subfamily B, member 1</i>)
LAK	lymfokinem aktivované zabíječské buňky (<i>Lymphokine-Activated Killer cell</i>)
LAT	cytozolická adaptorová molekula (<i>Linker of Activated T cells</i>)
LB médium/agar	médium/agar Luria-Bertani
LILR	imunoglobulinové NK receptory (<i>Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors</i>)
LIN-ILC	skupina přirozených leukocytů (<i>Lineage-marker negative Innate Lymphoid Cells</i>)
LLT1	lidský ligand NKR-P1A (<i>Lectin-Like Transcript 1</i>)
LRC	genový klastr kódující imunoglobulinové receptory (<i>Leukocyte Receptor Complex</i>)
LTi	skupina přirozených leukocytů (<i>Lymphoid Tissue inducer cells</i>)
MALDI	desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)

MALT	lymfoidní tkáň asociovaná s mukózou (<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MOPS	kyselina 3-(N-morpholino)propansulfonová
MPR	receptor pro manózu-6-fosfát (<i>Mannose-6-Phosphate Receptor</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (<i>Mass Spectrometry</i>)
NCR	imunoglobulinové NK receptory (<i>Natural Cytotoxicity Receptor</i>)
NHS ester	N-hydroxysukcinimid ester
NK buňka	přirozený zabíječ (<i>Natural Killer cell</i>)
NKC	genový komplex kódující C-lektinové receptory (<i>Natural Killer gene Complex</i>)
Ocil/Clr-b	<i>Osteoclast Inhibitory Lectin</i>
OD	optická denzita
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI-9	inhibitor proteáz 9 (<i>Proteinase Inhibitor 9</i>)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid (<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PTK	protein tyrosin kináza
RCTL	kryší homolog C-lektinu Clr-b (<i>Rat C-Type Lectin-like</i>)
SDS	dodecyl síran sodný (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TCR	specifický receptor T buněk (<i>T Cell Receptor</i>)
TLR	<i>Toll-like</i> receptor
TNF	faktor nekrotizující nádory (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRAIL	s TNF asociovaný ligand spouštící apoptózu (<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>)
UniProt	proteinová databáze <i>Universal Protein Resource</i>
ZAP70	protein tyrosin kináza (<i>Zeta chain-Associated Protein kinase 70</i>)

1 LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1 Pozice NK buněk v rámci imunitního systému

Základní funkcí imunitního systému je schopnost bránit se infekčním agens a zároveň tolerovat struktury, které jsou organismu vlastní. Imunitní systém také zbavuje tělo odumřelých, poškozených a jinak pozměněných buněk – vykonává imunitní dohled.

Obecně imunitní systém identifikuje molekuly, jež jsou organismu cizí (za patologických podmínek však může rozpoznávat i vlastní komponenty a dochází k rozvoji autoimunity). Příkladem jsou molekuly mikrobiálního či virového původu, nebo aloantigeny. To však není jediný mechanismus obrany organismu před infekcemi. Důležitým aspektem je též schopnost identifikovat abnormální expresi vlastních („self“) znaků, k níž může docházet v důsledku stresu, virové infekce či nádorové transformace¹. A právě tyto změny v expresi dokážou zachytit NK (*Natural Killer*) buňky, což je v rámci imunitního systému staví do důležité pozice z hlediska udržování homeostáze v organismu.

NK buňky byly objeveny již roku 1975 Rolfem Kiesslingem², avšak jejich definice dodnes není tak jednoznačná jako v případě T či B lymfocytů. Ty se dají vymezit pomocí jejich specifických receptorů TCR (*T Cell Receptor*) a BCR (*B Cell Receptor*), které těmto buňkám dávají schopnost velmi efektivně reagovat na tělu neznámé struktury díky odpovědi adaptivního typu. NK buňky se stejně jako T a B lymfocyty vyvíjejí ze stejného lymfoidního progenitoru a sdílí s nimi mnohé vlastnosti, jsou však součástí vrozené imunity. Lze je tedy charakterizovat jako vrozené lymfocyty, jež na svém povrchu nenesou TCR ani BCR³, jako tzv. „nulové“ buňky^{4,5}. NK buňky na svém povrchu nemají znak, který by je striktně odděloval od dalších buněčných populací, nicméně nejbližší jim jsou $\gamma\delta$ T lymfocyty a iNKT (*invariant Natural Killer*) buňky. Spojuje je exprese molekul, jako je CD2, CD7, CD90 nebo IFN- γ . Dále mají společnou produkci perforinu či granzymu, které NK buňkám umožňují být cytotoxicky aktivní, a to jako jediné z ILC (*Innate Lymphoid Cell*)*⁶.

* ILC jsou nedávno identifikovanou skupinou buněk lymfoidní linie, které jsou dalším zdrojem cytokinů asociovaných s T_H-buněčnou odpovědí. Imunoregulační cytokiny produkují v časně fázi infekce, mají tedy nejspíše významnou roli v obraně organismu.

NK buňky lze alespoň částečně definovat pomocí některých znaků, které sdílí s jinými buněčnými typy. S buňkami myeloidní linie mají společné povrchové markery CD11b a CD11c⁷. Jako charakteristický znak lidských NK buněk bývají uváděny molekuly CD16 a CD56⁸, ty však nejsou pro tyto buňky tak specifické jako receptory NCR (*Natural Cytotoxicity Receptors*), mezi něž patří NKp30⁹ a NKp46¹⁰, které jsou exprimovány jak na klidových, tak aktivovaných NK buňkách¹¹. Pro myši NK buňky je typická exprese molekuly CD27¹².

Mezi lymfocyty jsou NK buňky zastoupeny v periferní krvi 5 – 15 %^{13,14}.

1.2 Vývoj, typy a anatomická lokalizace NK buněk

Nejčastěji se uvádí, že se NK buňky diferencují z lymfoidního progenitoru vznikajícího z pluripotentních CD34⁺ hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni. Byly však objeveny populace buněk mimo kostní dřeň, jež by mohly být nejčasnějším prekurzorem pro vývoj T a NK buněk, například v tonsilách¹⁵.

Maturace NK buněk probíhá podobně jako u jiných leukocytů. Jednotlivá vývojová stádia jsou reprezentována různými imunofenotypy, jež se liší expresí (nebo jen její mírou) povrchových molekul¹⁴. Důležitým bodem v maturaci NK buněk je přítomnost receptoru pro IL-15 (IL-15R), který zajišťuje jejich selektivní diferenciaci, funkční maturaci a přežití vůbec¹⁶. Důkazem významnosti exprese IL-15R je podstatně snížený počet maturovaných NK buněk u myši s deficiencí tohoto receptoru či jiné komponenty zahrnuté v této signalizaci¹⁷. Nejdůležitějšími cytokiny potřebnými pro maturaci, aktivaci a přežití NK buněk jsou IL-2, -12, -15, -18, -21 a IFN I. typu¹⁸.

Pro správný vývoj NK buněk je důležité, aby postupně získávaly funkční receptory v přesně daném pořadí. U člověka musí nejprve dojít k expresi receptoru CD161, poté CD56, CD94/NKG2A, NKp46 a NKG2D, na závěr KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*) a CD16¹⁹. Vývojová stádia lidských NK buněk však nejsou zatím popsána zcela jasně¹⁴. U myši začíná exprese receptory NK1.1, CD94/NKG2A a NKp46, pak následují Ly49 a DX5, nakonec CD43 a CD11b²⁰. Maturovaná NK buňka je schopna produkce IFN- γ a cytotoxické aktivity zprostředkované perforinem.

ILC nejsou součástí adaptivní imunity a na svém povrchu nemají žádný znak, který by je odlišoval od jiných buněčných populací. Kromě NK buněk sem byly zařazeny tzv. LIN-ILC (*Lineage-marker negative*) a LTi (*Lymphoid Tissue inducer*) buňky⁶.

Na základě míry exprese CD56 byly definovány dva typy lidských NK buněk. Buňky s vysokou expresí této molekuly jsou označovány CD56^{bright} a jsou lokalizovány v sekundárních lymfoidních orgánech (tonzily či lymfatické uzliny). V řádu minut po jejich aktivaci produkují množství cytokinů (IFN- γ , TNF- β , GM-CSF, IL-10, IL-13) a chemokinů, ale postrádají schopnost bez předchozí stimulace zabít nádorové buňky^{21,22}. Druhá skupina NK buněk, CD56^{dim}, je zastoupena především v kostní dřeni a slezině. CD56^{dim} buňky produkují podstatně méně cytokinů, ale některé z nich jsou spontánně cytotoxicky aktivní vůči nádorovým buňkám. Existují důkazy naznačující, že posledním krokem ve vývoji NK buněk je jejich přechod z populace CD56^{bright} na CD56^{dim}²¹. To ovšem nevylučuje, že každá z nich má jinou, avšak neméně důležitou roli v imunitní odpovědi. Dobrým příkladem jsou deciduální NK (dNK) buňky s fenotypem CD56^{bright}, jež tvoří během časného těhotenství 50 – 90 % lymfocytů v děloze. Jejich úkolem je tlumit reaktivitu imunitního systému matky vůči hemi-alogenním buňkám fétu, které vcestovávají do sliznice dělohy. Tolerance je zajištěna prostřednictvím interakce inhibičních receptorů KIR na povrchu dNK buněk matky a jejich ligandů (především neklasických MHC molekul HLA-E) na povrchu fétu²³.

Fenotyp NK buněk tedy závisí na jejich lokalizaci, která přímo souvisí s jejich funkcí. Vývoj NK buněk je také usměrňován mikroprostředím, v němž se právě nachází²⁴.

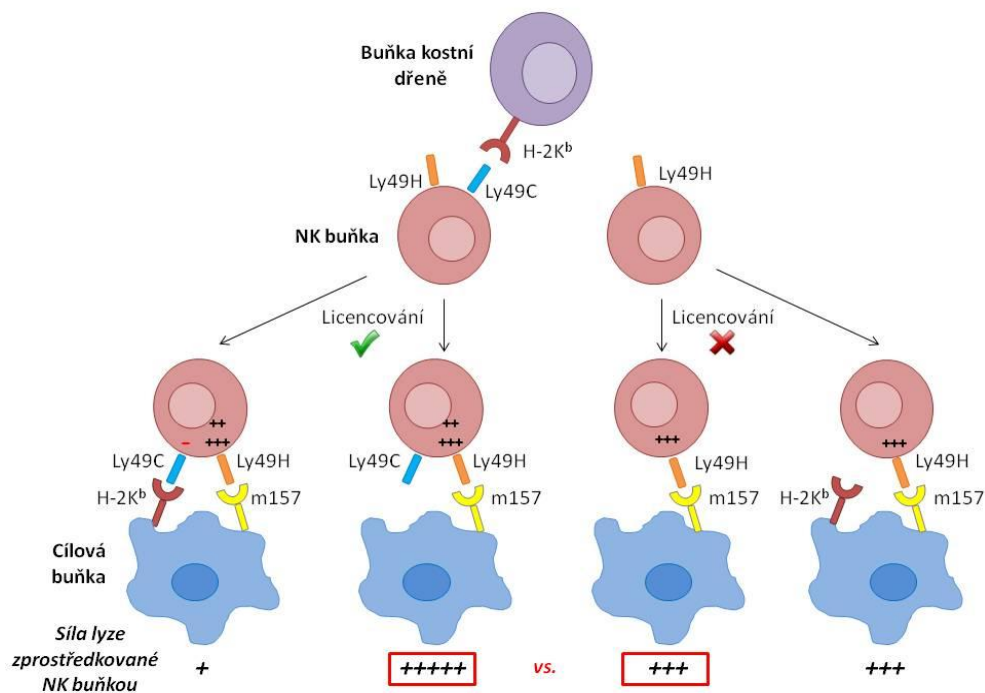
Lidské NK buňky lze izolovat z kostní dřene, jater, dělohy, sleziny a plic. V menší míře pak ze sekundárních lymfoidních orgánů, lymfoidních tkání asociovaných s mukózou (MALT) a z thymu (jejich vývoj je ale na thymu nezávislý)¹⁴.

Myší CD11b⁺ NK buňky se dělí dle rozsahu exprese molekuly CD27 též do dvou skupin. Populace buněk CD27^{low} je přísně regulována svými inhibičními receptory, tudíž pro plnou aktivaci musí překonat „vyšší práh“ oproti CD27^{high} buňkám, které jsou tedy funkčně aktivnější (produkují větší množství cytokinů a jsou cytotoxicky více aktivní) a komunikují s dendritickými buňkami (DC). Buňky CD27^{low} cirkulují v periferní krvi a nachází se v plicích. CD27^{high} odpovídají na různé chemokiny, což souvisí s jejich distribucí v různých tkáních (kromě kostní dřene také slezina, lymfatické uzliny nebo játra). Podobně jako tomu bylo i u lidských NK buněk, CD27^{high} dávají vznik CD27^{low} buňkám¹².

Nejvíce myších NK buněk je soustředěno v plicích, dále v játrech, periferní krvi, slezině, kostní dřeni a v menším zastoupení také v lymfatických uzlinách²⁵.

Důležitou součástí vývoje NK buněk je také fáze zvaná licencování, jež pomáhá zajistit toleranci k vlastním tkáním. NK buňky jsou regulovány MHC glykoproteiny I. třídy, které jsou nejčastějšími ligandy inhibičních NK-buněčných receptorů. Vazbou inhibičního „self“ receptoru na konkrétní alelu MHC se NK buňka učí rozpoznat vlastní molekulu²⁶. Pokud k této vazbě nedojde a NK buňka zároveň rozezná cizorodou molekulu (např. virového původu), cytotoxicita je silnější než u buňky nelicencované (obrázek 1.1). Tento princip se uplatňuje i u rejekce štěpu po transplantaci, kdy je odhojení NK buňkami tím silnější, čím více inhibičních ligandů (konkrétních MHC alel) příjemci chybí.

Za konečné diferenační stádium jak u lidských, tak myších NK buněk může být považován vznik dlouho žijících paměťových NK buněk¹⁴.



Obrázek 1.1: Znárodnění průběhu licencování NK buňky a rozdíl v síle cytotoxické aktivity mezi buňkami, které procesem prošly a kterých se nedotkl.

Licencované NK buňky, které se během vývoje naučily rozeznávat vlastní molekuly, reagují na infikované buňky silněji než buňky nelicencované.

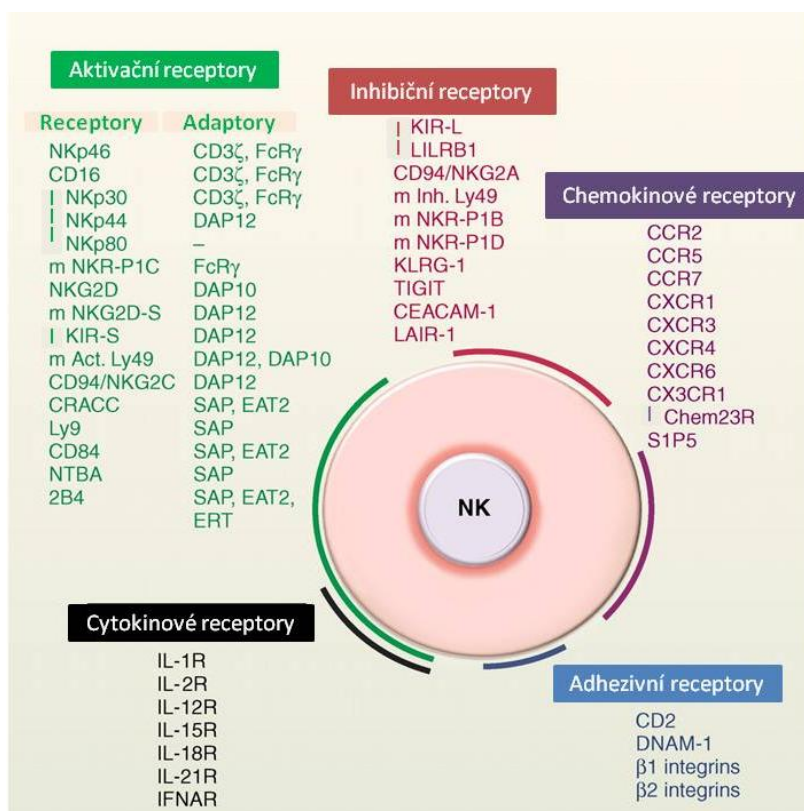
H-2K^b je myší alela MHC glykoproteinů I. třídy, Ly49C inhibiční „self“ receptor, Ly49H aktivační receptor, m157 protein kódovaný myším cytomegalovirem. Vytvořeno podle²⁷

1.3 Principy aktivace NK buněk

Receptory NK buněk se z funkčního hlediska dělí na aktivační a inhibiční (kromě dalších, mezi něž patří cytokinové, chemokinové a adhezivní receptory; obrázek 1.2). NK buňka je aktivována, jestliže signály z aktivačních receptorů překonají tzv. aktivační práh a převáží signály z receptorů inhibičních.

Na základě ligandů NK receptorů byly popsány hypotézy, jak NK buňka identifikuje cílové buňky. První z nich je hypotéza zvaná „missing-self“ rozpoznání, kdy NK buňka zjistí sníženou expresi až absenci „self“-molekul²⁷, které za nepatologických podmínek brzdí její cytotoxickou aktivitu. Mezi tyto molekuly tedy patří ligandy inhibičních NK-buněčných receptorů, především MHC glykoproteiny I. třídy a pak také non-MHC ligandy, jako je například Clr-b, ligand myšského receptoru NKR-P1B. Ke snížené expresi může docházet v důsledku nádorové transformace nebo infekce virem^{1,28,29}.

Tento způsob rozpoznání cílové buňky se stává velmi důležitým především v tom případě, týká-li se snížení exprese MHC glykoproteinů I. třídy. S nimi jsou v komplexu vystavovány peptidy virového či nádorového původu, které jsou cílem CD8⁺ T lymfocytů. Takto pozměněné buňky se pak pro ně stávají neviditelnými.



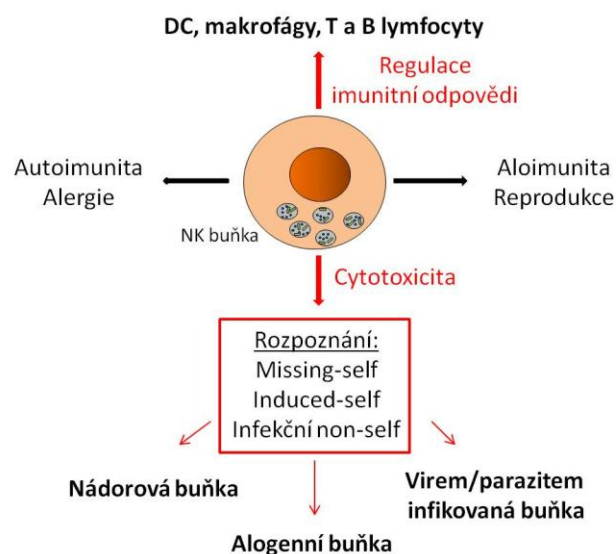
Obrázek 1. 2: Receptory NK buněk z funkčního hlediska. „m“ označují myšské receptory, „l“ lidské; ostatní receptory exprimují oba organismy. Upraveno³¹

Další hypotézou je tzv. „*stress induced-self*“ rozpoznání, kdy vlivem různých forem buněčného stresu, včetně nádorové transformace, naopak stoupá exprese některých „*self*“-molekul (většinou homologů MHC glykoproteinů I. třídy), ligandů aktivačních NK receptorů. To způsobí nárůst pozitivního signálu a spuštění cytotoxické aktivity. Příkladem takové molekuly u myši je MULT1, ligand receptoru NKG2D³⁰.

Poslední hypotéza, rozpoznání infekčních „*non-self*“ ligandů, je založena na vazbě cizorodých molekul aktivačními NK receptory (Ly49H a virový protein m157 u myši), případně Toll-like receptory (TLR), jež NK buňky také exprimují³¹.

1.4 Funkce NK buněk

NK buňky jako součást vrozené imunity, tedy bez antigeně specifických receptorů a bez nutnosti předchozí stimulace, tvoří první linii obrany organismu před infekcemi. Jsou schopny rozeznat virem či parazitem infikované buňky, transformované a alogenní buňky. Účastní se také regulace imunitní odpovědi a mají roli v transplantační imunitě, autoimunitě nebo reprodukci (obrázek 1.3).



Obrázek 1.3: Funkce NK buněk.

NK buňky zabíjejí pozměněné či infikované buňky a regulují imunitní odpověď. Mají podíl na reprodukci, transplantační reakci a za patologických podmínek také na autoimunitách či alergiích.

1.4.1 Cytotoxická aktivita

Způsob, jakým NK buňky zabíjejí buňky cílové, se nazývá cytotoxická aktivita. Jsou popsány tři cesty vedoucí k jejímu spuštění: prostřednictvím enzymů perforin a granzym, protilátkami a receptory smrti (obrázek 1.4).

Cytotoxická aktivita zprostředkovaná perforinem a granzymem

Podstatou tohoto typu cytotoxické aktivity je exocytóza cytotoxických granul (modifikovaných sekrečních lyzozómů³²) obsahujících enzymy perforin a granzym směrem k cílové buňce, u níž je následně vyvolána apoptóza. Aby mohla být cytotoxická reakce zahájena, musí mezi buňkami vzniknout imunologická synapse³³. Kromě NK buněk mají tuto schopnost také cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty a LAK (*Lymphokine-Activated Killer*) buňky.

Granzymy jsou serinové proteázy tvořící rodinu o pěti členech u člověka (granzym A, B, H, K a M) a o deseti u myši (granzym A – G, K, M, N)³⁴. V cytotoxických granulích je lokalizován granzym B, který se od ostatních granzymů liší tím, že štěpí za aspartátem. Iniciuje štěpení proteinu Bid (*BH3 interacting domain*) z rodiny Bcl-2, uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií³⁵, fragmentaci DNA³⁶ a aktivaci prokaspáz³⁷. Lidský granzym B zprostředkovává buněčnou smrt především mitochondriální cestou, myši zase kaspázovou³⁴.

Funkce perforinu dosud není popsána zcela jasně, jisté je však to, že granzymem indukovaná buněčná smrt je na něm závislá. Důkazem jsou myši deficientní na perforin³⁸.

Jedním z navrhovaných způsobů, jak granzym proniká do buňky, je perforinem vyvolané poškození cytoplazmatické membrány závislé na iontech vápníku. V jejich přítomnosti perforin vytváří, podobně jako jeho homolog komplementová komponenta C9, v membráně buňky multimerní komplexy ve tvaru kruhu³⁹. Vznikají tak póry, jimiž granzym může pronikat prostou difúzí přímo do cytozolu⁴⁰.

Podle druhé teorie dochází k endocytóze granzymu B, který je uvolněn do cytozolu až z endozómů uvnitř buňky díky perforinu, který naruší jejich membránu⁴¹.

Třetí model kombinuje předchozí dvě teorie. Perforin vytvoří v cytoplazmatické membráně buňky malé póry, čímž vyvolá influx vápenatých iontů, jenž spustí opravu membrány, a to pomocí membrán intracelulárních vezikulů. Dalším krokem je rychlá

ko-endocytóza granzymu B a perforinu do obřích endozómů. Následuje uvolnění granzymu B do cytozolu činností perforinu⁴².

Samy NK buňky jsou před účinky perforinu chráněny. Již od jeho syntézy v endoplazmatickém retikulu je vázán na svůj inhibitor, chaperon kalretikulín⁴³. Dále je v jádře i cytoplazmě lokalizován inhibitor proteáz z rodiny serpinů PI-9 (*Proteinase Inhibitor 9*)⁴⁴ a na povrchu buňky lyzozomální proteáza katepsin B, která štěpí membránově vázaný perforin⁴⁵.

Je-li endocytóza bazického proteinu granzymu B závislá na receptorech, není zcela jasná⁴⁶. Byl popsán například receptor manózy-6-fosfátu (MPR), po jehož specifické blokaci nedocházelo k vazbě granzymu B na povrch buňky a ani ke spuštění apoptózy⁴⁷. Tento objev byl však poté popřen a nahrazen teorií, že endocytóza granzymu B je na receptorech nezávislá, ale její rychlost ovlivňují negativně nabitě glykosaminoglykany, jako je heparan sulfát^{48,40}.

Cytotoxická aktivita zprostředkovaná protilátkami

Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC, *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*) představuje další možnost aktivace cytotoxické reakce u NK buněk. A to prostřednictvím receptoru FcγIIIa, který je exprimován také dendritickými buňkami, makrofágy a žírnými buňkami⁴⁹.

Aktivační receptor FcγIIIa, neboli CD16, je jedním ze tří typů Fcγ receptorů, který váže s nízkou afinitou Fc část protilátek třídy IgG (IgG1 a IgG3). Aby byla cytotoxická reakce spuštěna, musí být vazba protilátek na antigen multivalentní. NK buňky mají silnou expresi tohoto receptoru a naopak jako jediné buňky současně neexprimují inhibiční receptor FcγIIb. Díky tomu jsou hlavními mediátory ADCC. Aktivita jiných typů buněk je přísně regulována na základě poměru signálů z aktivačních a inhibičních Fcγ receptorů⁵⁰. ADCC může být ještě zesílena prostřednictvím dalších aktivačních receptorů, jež působí synergicky⁵¹.

Rozpoznání cílové buňky opsonizované protilátkou IgG prostřednictvím receptoru CD16 vede opět k exocytóze perforinu a granzymu a končí buněčnou smrtí cílové buňky, ať už mitochondriální, nebo kaspázovou cestou⁴⁹.

Některé studie prokazují, že mechanismus ADCC by se mohl uplatňovat při léčbě některých druhů rakoviny^{52,53}, a to pomocí monoklonálních protilátek s Fc doménou modifikovanou například tak, aby měla vyšší afinitu k receptoru CD16⁵⁴.

Cytotoxická aktivita zprostředkovaná receptory smrti (TRAIL-R, FasR)

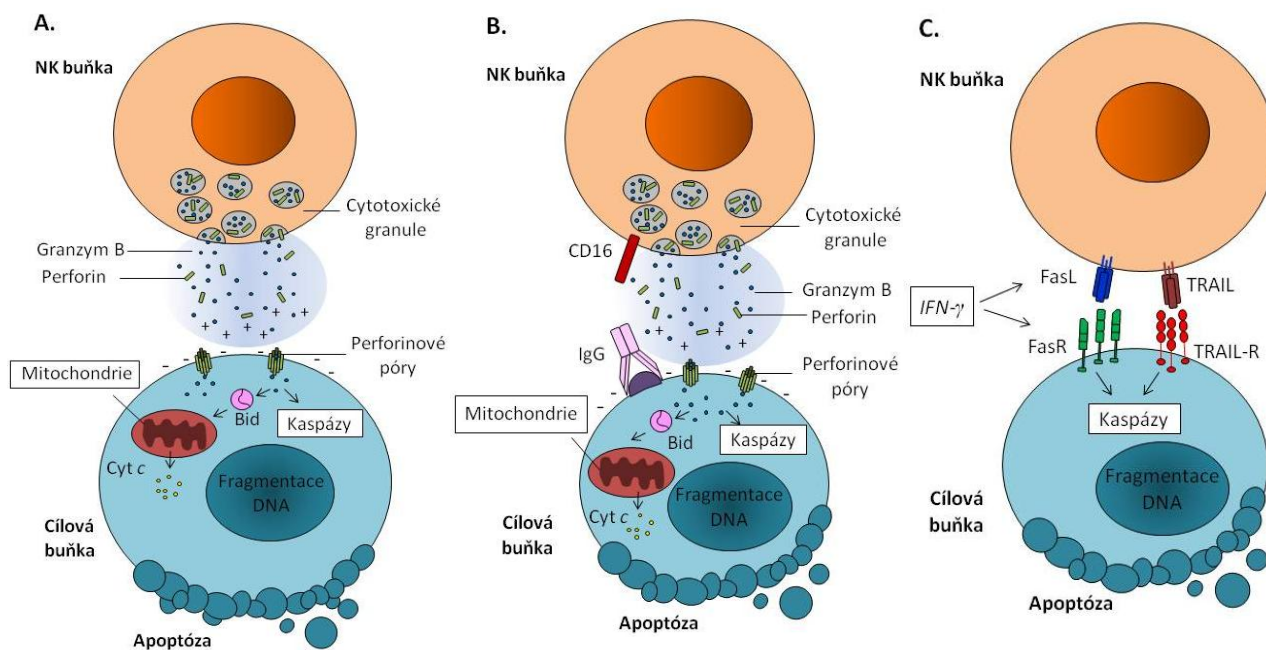
TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*), neboli Apo2 ligand, je transmembránový protein exprimovaný NK buňkami. Patří do rodiny cytokinů TNF (*Tumor Necrosis Factor*), stejně jako Fas ligand (FasL, Apo1)⁵⁵.

Jak u člověka, tak u myši bylo identifikováno pět receptorů pro TRAIL (TRAIL-R). Z toho dva u člověka⁵⁶ a tři u myši mají ve své cytoplazmatické části tzv. domény smrti, díky nimž jsou schopny indukce apoptózy kaspázovou cestou. Ostatní receptory TRAIL slouží kromě jiného jako regulátory tohoto procesu⁵⁵.

FasL se váže na Fas receptor (FasR) cílových buňek a indukuje apoptózu též prostřednictvím domén smrti.

TRAIL ligandy jsou u většiny NK buněk silně exprimovány po stimulaci IL-2, interferony (α , β i γ) nebo IL-15⁵⁵. Exprese TRAIL a FasL na efektorových buňkách je ale hlavně závislá na IFN- γ , jenž má také vliv na citlivost nádorových buněk k tomuto typu cytotoxicity⁵⁷.

Zvýšení exprese TRAIL způsobené IFN I. typu naznačuje, že kromě protinádorové funkce je tento typ cytotoxicity významný i pro obranu organismu před virovými infekcemi způsobovanými například virem EMCV (*Encephalomyocarditis virus*)⁵⁸ nebo CMV (*Cytomegalovirus*)⁵⁵.



Obrázek 1.4: Cytotoxická aktivita NK buněk. Cytotoxicita zprostředkovaná **A.** perforinem a granzymem, **B.** protilátkami (ADCC) a **C.** receptory smrti (TRAIL-R, FasR).

1.4.2 Regulace imunitní odpovědi NK buňkami

NK buňky modulují imunitní odpověď jak sekrecí cytokinů, tak buněčným kontaktem. Mají vliv na makrofágy, DC nebo na T a B lymfocyty⁵⁹.

Jejich hlavními produkty jsou prozánětlivé cytokiny IFN- γ a TNF- α , protizánětlivý IL-10 a růstové faktory GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) a IL-3⁶⁰. NK buňky také sekretují chemokiny (RANTES, MIP1- α a další⁶¹), které jsou důležité pro jejich lokalizaci do tkání postižených zánětem.

IFN- γ především zabraňuje šíření infekce v organismu a zesiluje imunitní odpověď T lymfocytů (v lymfatických uzlinách podporuje T_H1 polarizaci)⁶² a makrofágů. Opačný efekt má na tyto buňky IL-10⁶⁰. TNF- α má protinádorové účinky a společně s IFN- γ podporují maturaci DC⁶³. Zralé DC produkují IL-12, jenž zase zpětně působí na NK buňky a podporuje produkci IFN- γ ⁶¹.

DC a NK buňky na sebe působí i přímým buněčným kontaktem, který může vést k aktivaci NK buňky, aktivaci DC, nebo smrti nezralé DC (v důsledku nedostatečné exprese ligandů inhibičních NK-buněčných receptorů)^{64,65}. Tím je regulována síla adaptivní imunitní odpovědi, jelikož maturované DC jsou profesionálními antigen-prezentujícími buňkami, které stimulují CD8⁺ a CD4⁺ T lymfocyty prostřednictvím peptidů vystavovaných v komplexu s MHC glykoproteiny I. nebo II. třídy na svém povrchu.

NK buňky také regulují proliferaci a aktivitu T lymfocytů. Jednou z variant je indukce apoptózy u T lymfocytů z důvodu nedostatečného množství MHC glykoproteinů na jejich povrchu²⁷. Další možnosti jsou popsány v následující kapitole, v úseku o reprodukci.

1.4.3 Další funkce NK buněk

Reprodukce

Pro vývoj fétu je důležité potlačovat matčin imunitní systém, ale zároveň prostředí dělohy chránit před infekcemi. Tuto dvojí roli zastávají deciduální NK buňky a na tlumení imunitní odpovědi se podílejí také indukované regulační T lymfocyty (*iTreg*).

iTreg vznikají na periférii z antigen-specifických T lymfocytů, které jsou schopny rozeznat „non-self“ molekuly. *iTreg* mohou tudíž potlačovat T-buněčnou imunitní odpověď i vůči cizím (paternálním) molekulám na rozdíl od klasických regulačních

T lymfocytů. Ty vznikají přímo v thymu a dokážou tlumit imunitní odpověď pouze proti vlastním antigenům⁶⁶. NK buňky inhibují proliferaci a sekreci cytokinů T lymfocyty⁶⁷, nebo zabíjejí aktivované T lymfocyty, které exprimují ligandy pro jejich aktivační receptor NKG2D⁶⁸. Cytotoxická aktivita samotných NK buněk je tlumena interakcí jejich inhibičního receptoru NKG2A s molekulami HLA-E na povrchu fétu²³.

Funkce dNK buněk se odvíjí od síly příchozích stimulačních signálů. Jestliže jsou NK buňky stimulovány slabě, jejich úloha je regulační. Naopak dojde-li k silné stimulaci, třeba prostřednictvím TLR 3, je spuštěna cytotoxicita⁶⁹, která vede buď k eliminaci potenciální infekce, nebo k poškození fétu.

NK buňky také podporují růst placenty sekrecí různých růstových faktorů, vaskularizaci trofoblastu angiogenními faktory a účastní se i jeho invaginace⁶⁶.

Aloimunita

Aloimunita je reakce organismu na antigeny pocházející od jiného jedince stejného živočišného druhu. Je zapříčiněna CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty, mononukleárními leukocyty, B lymfocyty a NK buňkami⁷⁰. Důležité je také cytokinové mikroprostředí určující směr polarizace imunitní odpovědi.

Po transplantaci dochází k rejekci štěpu NK buňkami, jestliže na jeho povrchu nenajdou ligandy svých inhibičních receptorů (konkrétní alely MHC glykoproteinů I. třídy, které by vázaly inhibiční receptory KIR). Neexistuje tedy signál bránící NK buňkám v aktivaci („missing-self“ rozpoznání)⁷¹. O síle rejekce rozhoduje počet těchto „chybějících“ ligandů a také to, zda NK buňka prošla procesem licencování (viz kapitola 1.2).

NK buňky ovlivňují aloimunitní odpověď produkcí prozánětlivých cytokinů IFN- γ a TNF- α . Ty podporují maturaci APC zvýšením exprese MHC glykoproteinů a kostimulačních molekul na jejich povrchu. APC pak aktivují T lymfocyty, které začnou ničit alogenní buňky^{71,72}. Aloimunita je dále posilována tím, že NK buňky jsou schopny zabít regulační T lymfocyty⁷¹.

NK buňky v rámci transplantací působí i pozitivně. Dárcovy aloreaktivní NK buňky přežívající v periferní krvi příjemce cílí leukemické buňky u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) nebo APC příjemce prezentující peptidy ze štěpu. Výsledkem je snížení úmrtnosti pacientů s AML o 55 % díky přítomnosti aloreaktivních NK buněk a potlačení GvHD (*Graft versus Host Disease*, reakce štěpu proti hostiteli)⁷³. NK buňky mohou také

podpořit toleranci vůči aloantigenům prostřednictvím sekrece tlumivého cytokinu IL-10⁷⁴.

Autoimunita

Porucha tolerance vlastních tkání NK buňkami může souviset s konkrétní kombinací alel pro NK receptory v genomu, kdy je vazbou na jejich ligandy vyvolávána cytotoxická aktivita, nebo je narušována regulace imunitní odpovědi (jsou ovlivňovány funkce dalších buněk). Například geny pro inhibiční receptor KIR2DL5 a aktivační KIR3DS1 jsou u španělské populace spojovány s roztroušenou sklerózou⁷⁵, podobně jako vyšší exprese varianty inhibičního CD161 u populace skandinávské⁷⁶.

Také zvýšení exprese ligandů, které jsou indukovány buněčným stresem, může vést k autoimunitám místo k eliminaci transformovaných či infikovaných buněk (MICA, ligand aktivačního receptoru NKG2D, a Crohnova choroba^{77,78}).

Alergie

Význam NK buněk v alergiích nebyl prozatím příliš prostudován. Je však známo, že populace NK buněk NK2 stimuluje prostřednictvím cytokinů IL-4, -5 a -13 B lymfocyty k produkci protilátek IgE, populace NK1 má opačný efekt⁷⁹. Protilátky IgE se vážou na Fc receptory žírných buněk a způsobují jejich degranulaci. Jsou uvolněny mediátory zánětu, například histamin nebo deriváty kyseliny arachidonové, které způsobují časně alergické projevy (konstrikci hladké svaloviny či rozšíření cév) a spouští zánět⁸⁰.

Bylo také zjištěno, že na vývinu onemocnění se podílí počet NK buněk v periferní krvi a především dendritické buňky, jež jsou NK buňkami regulovány. Snížený počet NK buněk (např. u pacientů s alergickou rýmou nebo intermitentním astmatem) neumožňuje dostatečně efektivní regulaci maturace DC nebo jejich eliminaci, což vede k převaze T_H2 imunitní odpovědi⁸¹.

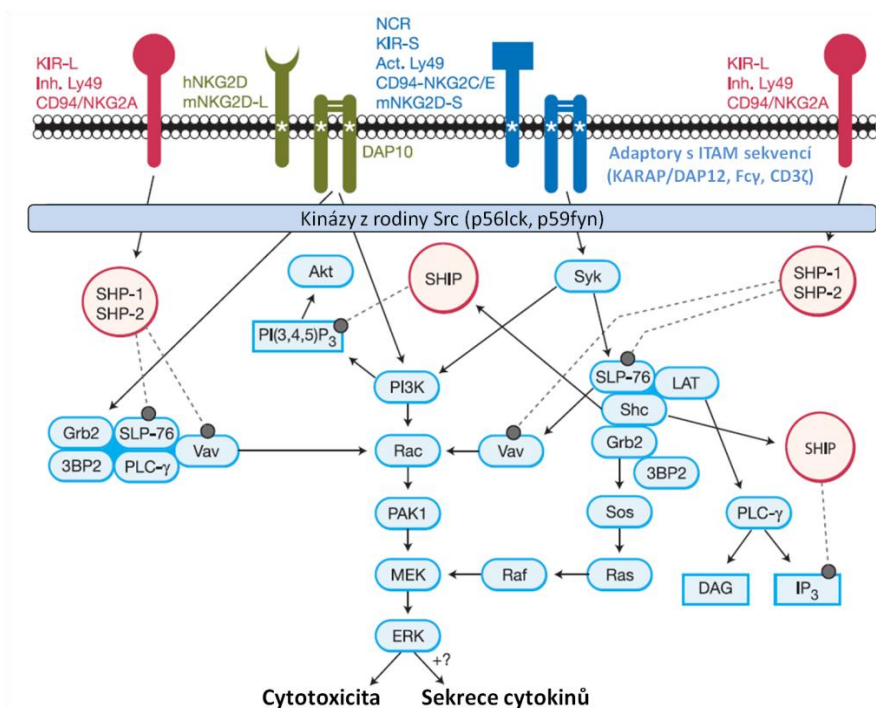
U alergického onemocnění dýchacích cest na myším modelu bylo nedávno prokázáno, že NK buňky hrají ve vývinu alergie prozánětlivou roli. Byla tedy znovu potvrzena souvislost s jejich vlivem na T_H2 imunitní odpověď v důsledku neschopnosti podpořit maturaci DC⁸².

1.5 NK-buněčná signalizace

Výsledek signalizace je u NK buněk dán poměrem součtu simultánně přichozících signálů z aktivačních a inhibičních receptorů.

1.5.1 Signalizace zprostředkovaná aktivačními receptory

Po vazbě ligandu aktivačními receptory je signál přenášen do buňky pomocí adaptorových molekul nesoucích jeden nebo tři aktivační motivy založené na tyrosinu (tzv. ITAM sekvence, *Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motives*). Adaptory, mezi něž patří KARAP/DAP12 (*Killer cell-Activating Receptor-Associated Protein*), FcR γ nebo CD3 ζ , asociují s aktivačními receptory prostřednictvím opačně nabitých aminokyselin v transmembránové části. Tím jsou aktivovány protein tyrosin kinázy (PTK) z rodiny Src (například p56lck a p59fyn), které pak fosforylují tyrosiny v ITAM sekvenci adaptorů. To vede k aktivaci PTK rodiny Syk (Syk či ZAP70). Následně vstupují do signalizace transmembránové nebo cytozolické adaptorové molekuly, jako je LAT (*Linker of Activated T cells*), které jsou schopny vázat a fosforylovat několik signalizačních molekul najednou, a tak integrovat množství přichozících signálů (obrázek 1.5). Kaskáda dalších kináz nakonec vyústí v redistribuci a exocytózu cytotoxických granul směrem k cílové buňce díky přeuspořádání aktinového cytoskeletu. Signalizace probíhá podobně u T a B lymfocytů^{83,84}.



Obrázek 1. 5: Schéma signalizace u NK buněk.

Kaskády vedoucí k aktivaci cytotoxicity (modře). K expresi genů pro cytokiny je vyžadována jiná signalizační dráha⁸⁵. Upraveno⁸⁴

1.5.2 Signalizace zprostředkovaná inhibičními receptory

Receptory NK buněk přenášející tlumivé signály mají přímo ve své cytoplazmatické části inhibiční motiv ITIM (*Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif*). Po vazbě ligandu dochází k fosforylaci tyrosinu v ITIM sekvenci, nejspíše opět Src kinázami, kam se díky tomu mohou vázat a aktivovat se tyrosinové fosfatázy SHP-1⁸⁵ nebo SHP-2⁸⁶ (případně lipidové fosfatázy SHIP-1⁸⁵, jež štěpí fosfatidylinositoltrifosfát). Fosfatázy defosforylují substráty PTK účastnících se aktivační NK-buněčné signalizace. Tím je zabráněno degranulaci NK buněk, produkci cytokinů a také proliferaci⁸⁴.

1.6 NK receptory

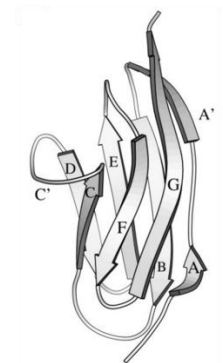
Receptory NK buněk se ze strukturního hlediska dělí na imunoglobulinové a C-lektinové. Detailněji jsou popisovány C-lektinové receptory, především pak proteiny NKR-P1B a Clr-b, jimiž se tato diplomová práce zabývá.

1.6.1 Imunoglobulinové receptory

Imunoglobulinová (Ig) doména se skládá ze dvou antiparalelně orientovaných β -listů⁸⁷ (viz obrázek 1.6) a je součástí mnoha různých proteinů s odlišnou funkcí (povrchové receptory, adhezivní molekuly nebo svalové proteiny)⁸⁸.

Imunoglobulinové NK-buněčné receptory jsou u člověka kódovány leukocytárním receptorovým komplexem LRC (*Leukocyte Receptor Complex*) na chromozómu 19⁸⁹. Jsou to transmembránové proteiny I. typu s různým počtem Ig domén (dvěma až čtyřmi) oddělených od cytoplazmatické membrány krátkým krčkem⁹⁰.

Rodiny imunoglobulinových receptorů (KIR, LILR a NCR) jsou uvedeny i s jejich ligandy v tabulce 1.1.



Obrázek 1. 6: Struktura imunoglobulinové domény.

Převzato⁸⁸

	KIR	LILR	NCR
ligand u myši	-	-	<i>F. nucleatum</i> , buňky nakažené chřipkovým virem
ligand u člověka	HLA a jimi prezentované peptidy	HLA, UL18	virové struktury, heparin, HSPG, BAT3, B7-H6

Tabulka 1.1: Rodiny NK receptorů imunoglobulinového typu u myši a člověka a jejich popsané ligandy. UL18 je protein z lidského cytomegaloviru; BAT3 a B7-H6 jsou nádorové antigeny^{91,92}; HSPG je proteoglykan heparan sulfát. Převzato a upraveno⁹³

Jediným receptorem, který je mezi uvedenými rodinami popsán i u myši, je NKp46 z rodiny NCR⁹¹.

Nejčastějšími ligandy těchto receptorů jsou MHC glykoproteiny I. třídy, ale také peptidy na nich prezentované, hostitelské proteiny, jejichž exprese je ovlivňována fyziologickým stavem buňky, nebo virové struktury. Interakce NK buňky s těmito ligandy tedy může vést jak k aktivaci, tak inhibici cytotoxicity.

V případech konkrétní alelické kombinace KIR a především HLA genů byla zjištěna schopnost jedinců bránit se infekci virem HIV. Konkrétně by se mohlo jednat například o alelu KIR3DS1, která přímo, nebo nepřímo rozeznává virový peptid prezentovaný na molekulách HLA-B Bw4-80I (podskupina HLA-B molekul s isoleucinem na pozici 80). Tento genetický polymorfismus vyvíjí na virus evoluční tlak a poskytuje hostiteli výhodu (v rámci populace)^{92,93}.

U receptorů NCR (NKp30, NKp44 a NKp46) byla prokázána silná protivirová a protinádorová funkce. Všechny NCR váží heparin nebo HSPG (proteoglykan heparan sulfát)⁹⁴, jejichž exprese je zvýšena v nádorových buňkách⁹⁵. Aktivují tedy NK buňky podle hypotézy „*stress induced-self*“ rozpoznání. Hlavní aktivační receptor lidských NK buněk, NKp30, rozpoznává také nádorový antigen B7-H6⁹⁶ nebo BAT3⁹⁷.

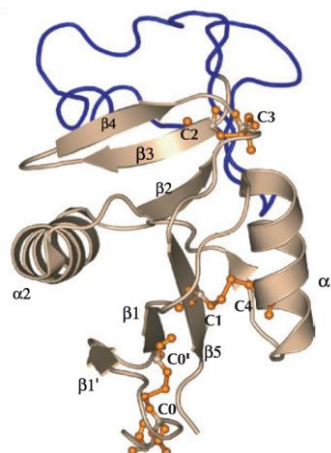
1.6.2 C-lektinové receptory

Skupina receptorů označovaných jako „C-lektiny“ je v užším slova smyslu definována schopností vázat v přítomnosti vápenatých iontů sacharidy. Toto označení (nebo též CTLR, *C-Type Lectin-like Receptors*) je ale používáno i pro receptory interagující s proteiny, což je případ NK-buněčných receptorů (tzv. KLR, *Killer cell Lectin-like Receptors*). Vazba je zprostředkována doménou zvanou CTLD (*C-Type Lectin-like Domain*) neohledě na typ ligandu⁹⁸.

C-lektinové NK receptory jsou kódovány genovým komplexem NKC (*Natural Killer gene Complex*) lokalizovaným na chromozómu 6 u lidí a 12 u myši⁸⁹. Jsou to transmembránové proteiny II. typu jedenkrát procházející membránou a mají jednu CTLD oddělenou od povrchu buňky krčkem^{98,99}.

CTLD se skládá ze dvou α -helixů, dvou antiparalelních β -listů a smyčky. Struktura je stabilizována dvěma až třemi intramolekulárními disulfidickými můstky (obrázek 1.7). CTLR pravděpodobně tvoří homo- či heterodimery spojené další disulfidickou vazbou v oblasti krčku^{98,99}.

Mezi C-lektinové receptory patří u NK buněk rodiny Ly49, CD94/NKG2 a NKR-P1 (KLRB1), které jsou společně s jejich známými ligandy uvedeny v tabulce 1.2.



Obrázek 1. 7: Struktura CTLD.

*Dva α -helixy, dva β -listy, smyčka (modře), disulfidické můstky (oranžově).
Převzato⁹⁸*

	Ly49	CD94/NKG2	NKR-P1
ligand u myši	H-2, m157	Qa-1	Clr
ligand u člověka	-	HLA-E	LLT1

Tabulka 1.2: Rodiny NK receptorů C-lektinového typu u myši a člověka a jejich popsané ligandy. *H-2 molekuly jsou klasické MHC glykoproteiny I. třídy; Qa-1 a HLA-E neklasické MHC glykoproteiny I. třídy; m157 je protein z myšičího cytomegaloviru; Clr a LLT1 jsou popsány níže.*

Převzato a upraveno⁹¹

Receptorová rodina Ly49 je myšičí (vyjma lidského pseudogenu Ly49L), jejich funkčními homology u lidí jsou imunoglobulinové receptory KIR⁹⁰. Jediným receptorem z rodiny NKR-P1 popsaným u člověka je inhibiční CD161 (NKR-P1A), jehož ligandem je

LLT1 (CLEC2D), homolog myších Clr (*C-type lectin related*) / CLEC2 (*C-type lectin-like receptor 2*) molekul⁹⁹.

Nejčastějšími ligandy C-lektinových receptorů, stejně jako imunoglobulinových, jsou MHC glykoproteiny I. třídy, některé ale také váží virové proteiny nebo molekuly, jejichž exprese je ovlivňována buněčným stresem. Jejich funkce může být tedy jak aktivační, tak inhibiční.

Rodina NKR-P1

Rodina NKR-P1 receptorů zahrnuje u myši 7 různých členů: NKR-P1A, B, C¹⁰⁰, D, E, F¹⁰¹ a G^{102,103} (viz tabulka 1.3, kde je uvedena také funkce receptorů a jejich známé ligandy).

	NKR-P1						
	A	B	C	D	E	F	G
funkce	aktivační	inhibiční	aktivační	inhibiční	pseudogen	aktivační	inhibiční
ligand u myši	?	Clr-b	?	Clr-b	-	Clr-c, -d, -g	Clr-d, -g, -f

Tabulka 1.3: Receptory z rodiny NKR-P1 u myši, jejich funkce a ligandy.

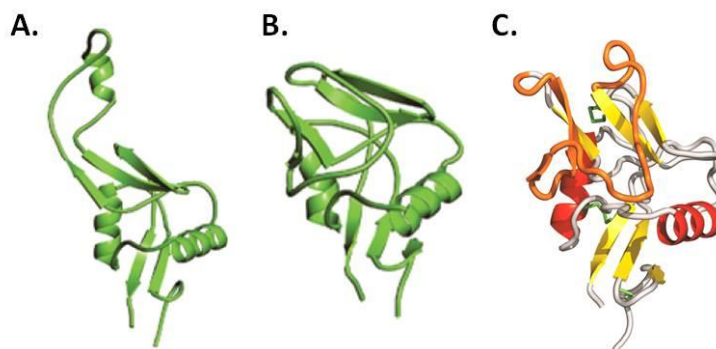
Ligandy myších receptorů NKR-P1A a C prozatím známy nejsou⁹⁹. Převzato a upraveno⁹³

Expresse jednotlivých NKR-P1 receptorů je variabilní a závisí na konkrétním myším kmenu. Receptory jsou vzájemně výrazně homologní v aminokyselinové sekvenci (>80 %), což souvisí s jejich alelickým polymorfismem (například receptor NKR-P1D u myšího kmene B6 je alelickou formou receptoru NKR-P1B u myši BALB/c¹⁰⁴).

NKR-P1E byl identifikován jako pseudogen¹⁰¹.

Kromě NK buněk mohou být některé NKR-P1 receptory exprimovány také na povrchu NKT buněk, T lymfocytů nebo dendritických buněk^{105,106}. NKR-P1 geny jsou evolučně konzervovány mezi hlodavci, vačnatci, primáty, dalšími savci a ptáky¹⁰⁷.

Struktura NKR-P1 receptorů prozatím nebyla vyřešena s výjimkou receptorů NKR-P1A a C z myšího kmene B6^{108,109,110} (obrázek 1.8).



Obrázek 1. 8: Struktura myších proteinů NKR-P1A a C.

A. Model NKR-P1A podle rentgenostrukturní analýzy; **B.** Model NKR-P1A a **C.** NKR-P1C vytvořený pomocí MS technik. Převzato a upraveno^{109,110}

Rodina NKR-P1 patří mezi C-lektiny, které neinteragují s MHC glykoproteiny I. třídy. Jejich ligandy jsou proteiny Clr, které jsou strukturně příbuzné C-lektinům a stejně jako NKR-P1 receptory leží v NKC genovém komplexu^{1,111}.

Receptor NKR-P1B (KLRB1B) je exprimován NK buňkami pouze některých myších kmenů, například BALB/c, SJL/J, NOD, NIH Swiss, 129S1 nebo CD1^{4,112}. Exprese NKR-P1B je přitom stochastická a týká se asi 60 % NK buněk¹¹³.

Protože se jedná o inhibiční receptor¹¹⁴, je důležitý pro udržování tolerance vlastních zdravých tkání NK buňkami.

Rodina Clr

Rodina myších Clr proteinů má 8 členů: Clr-a, b, c, d, e, f, g, h¹¹⁵, přičemž Clr-e je pseudogen¹⁰⁷.

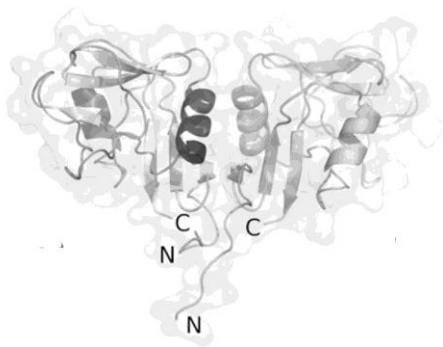
Míra exprese myších Clr proteinů a jejich tkáňová lokalizace se v rámci rodiny liší. Nejsilněji a téměř ve všech tkáních kromě mozku je exprimován Clr-b¹¹³, což odpovídá i dřívějším studiím, že Clr-b exprimuje většina jaderných hematopoetických buněk včetně rezidentních leukocytů^{1,111}. Exprese ostatních Clr proteinů je slabá v několika tkáních (například Clr-c v jazyku, slezině, thymu, vaječnicích/varlatech, lymfatických uzlinách), nebo omezena jen na jednu tkáň (Clr-a byl detekován pouze ve střevě a Clr-d v oku)¹¹³.

Některé buněčné typy, u nichž byla zjištěna exprese Clr proteinů, zahrnují například: maturované splenocyty, thymocyty, buňky lymfatických uzlin, dále lymfocyty nebo granulocyty (Clr-b)¹, epiteliální buňky sklery (Clr-d), epiteliální buňky střeva a ledvinových tubulů (Clr-f)¹¹³.

Takto vymezená exprese Clr proteinů v tkáních (na rozdíl od všudypřítomných MHC glykoproteinů I. třídy) naznačuje jejich důležitou regulační roli v imunitním dohledu (viz vysoká exprese Clr-b, ligandu inhibičního receptoru, a tolerance vlastních tkání).

Geny kódující proteiny Clr či jejich homology byly popsány u myši, krysy nebo člověka^{99,113}.

Struktura proteinů Clr též není prozatím známa, až na Clr-g z myšního kmene B6 (obrázek 1.9)¹¹⁶.



Obrázek 1. 9: Struktura myšního Clr-g.
Podle rentgenostrukturní analýzy tvoří dimer. Převzato a upraveno¹¹⁶

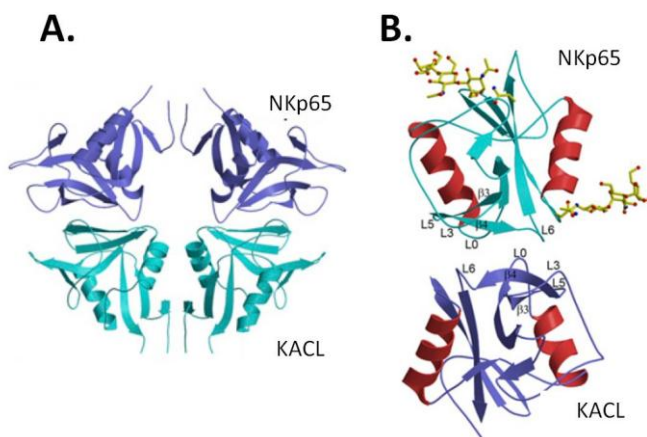
Interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b

Interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b byla popsána na buněčné úrovni roku 2004¹ a představuje druhý samostatný mechanismus regulující cytotoxicitu NK buněk vedle MHC glykoproteinů I. třídy.

Expresce *Clr-b* (*Clec2d*, *Ocil*) je snižována, a to na úrovni proteinu i mRNA, v nádorových buňkách či buňkách infikovaných virem^{1,117,29}, což vede ke spuštění cytotoxické aktivity NK buněk podle hypotézy „missing-self“ rozpoznání. Snižování exprese Clr-b na buňkách způsobují také chemoterapeutika, nebo spouštěče genotoxického a fyziologického stresu. Expresce MHC glykoproteinů I. třídy přitom zůstává neměnná¹¹⁸.

Během evoluce vyvinuly patogeny a nádory strategie založené na ovlivňování exprese MHC glykoproteinů I. třídy, které jim umožňují skrýt se před NK buňkami (jako je exprese homologů MHC glykoproteinů). Další systém nezávislý na MHC molekulách (NKR-P1B:Clr-b) ovlivňující aktivaci NK buněk je tedy výhodou. I zde však byl zjištěn nedostatek v podobě RCTL (*Rat C-Type Lectin-like*) proteinu kódovaného krysím cytomegalovirem, který je strukturním homologem Clr-b. Cytomegalovirus způsobí snížení exprese Clr-b, jenž je ale vzápětí nahrazen RCTL, který přímo interaguje s NKR-P1B a chrání tak infikované buňky¹¹⁷.

Jak již bylo zmíněno výše, mezi proteiny NKR-P1 a Clr jsou jedinými strukturně charakterizovanými myší NKR-P1A, NKR-P1C a Clr-g. U myší neexistuje žádný model popisující interakci některého proteinu z těchto dvou rodin s jeho ligandem na molekulární úrovni. Nedávno byl však vytvořen model komplexu lidského homologu Clr proteinů KACL (*Keratinocyte-Associated C-type Lectin*) a aktivačního receptoru příbuzného NKR-P1 rodině NKp65 (obrázek 1.10), a to včetně popisu interagujících aminokyselin a jejich pozice v rámci komplexu. Vazba mezi interagujícími partnery je silná ($K_D = 6,7 \cdot 10^{-10}$ M) díky jejich tvarové komplementaritě a propojení 17 vodíkovými můstky¹¹⁹.



Obrázek 1. 10: Struktura komplexu NKp65-KACL (rentgenostrukturní analýza).

A. Interakce homodimerního proteinu KACL se dvěma monomery NKp65.

B. Interakce proteinů je zajištěna prostřednictvím 20 aminokyselinových zbytků na smyčkách L0, L3, L5 a L6, a β -listech β_3 a β_4 proteinu NKp65 a 16 zbytků na týchž strukturách proteinu KACL. Převzato a upraveno¹¹⁹

2 CÍLE PRÁCE

- Příprava DNA konstruktů kódujících ligand-vazebnou a celou extracelulární část proteinu NKR-P1B

- Příprava ligand-vazebné a celé extracelulární části rekombinantního proteinu NKR-P1B zahrnující optimalizaci jejich produkce a renaturace

- Strukturní charakterizace obou forem proteinu NKR-P1B technikami hmotnostní spektrometrie (identifikace disulfidických můstků a chemické zesíťení)

- Analýza interakcí ligand-vazebné a celé extracelulární části proteinu NKR-P1B s jeho proteinovým ligandem Clr-b:
 - Biochemické metody (gelová filtrace, povrchová plazmonová rezonance)

 - Biologické metody (značení buněk kostní dřeně a tkáňových řezů fluorescenčně značeným proteinem NKR-P1B)

3 MATERIÁL

3.1 Přístroje

- Analytické váhy AL54-IC *Mettler Toledo, ČR*
- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Centrifuga Avanti J-26 XP *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga Spectrafuge 16M *Sigma-Aldrich, USA*
- Centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra *Millipore, USA*
- Dialyzační trubice Spektra/Por *Spektrum Laboratories, USA*
- Fluorescenční mikroskop Cell R *Olympus, USA*
- Hmotnostní spektrometr FT ICR Solarix XR™ *Bruker, Německo*
- HPLC systém NGC Quest™ 10
Chromatography System *Bio-Rad, USA*
- Magnetická míchačka Stuart CB161 *Keison, UK*
- Kryostat Leica CM3050 S *Leica Biosystems, UK*
- Monochromátorová čtečka destiček Safire² *Tecan, Švýcarsko*
- Mrazicí box na -80 °C *Revco, USA*
- pH metr Φ200 *Beckman Coulter, USA*
- Předvážky HF-1200G *AND, USA*
- Souprava pro SDS-PAGE elektroforézu *Bio-Rad, USA*
- Souprava pro ultrafiltraci *Millipore, USA*
- Spektrometr DU-70 *Beckman Coulter, USA*
- Systém na focení gelů G:Box HR *Syngene, UK*
- Termocyklér Mastercycler personal *Eppendorf, Německo*
- Třepačka na Erlenmayerovy baňky *Gallenkamp Ltd., UK*
- Třepačka na zkumavky
Thermomixer comfort *Eppendorf, Německo*
- Ultracentrifuga Optima LE-80K *Beckman Coulter, USA*
- Ultrafiltrační membrána *Millipore, USA*
- Ultrazvuková lázeň Sonorex *Bandelin, Německo*
- Ultrazvuková sonda Ultrasonic
Homogenizer4710 *Cole-Parmer Instrum. Co., USA*
- Vakuová odparka SpeedVac *Jouan, Francie*
- Vortexový mixér *VELP Scientifica, Itálie*
- Zdroj deionizované vody MilliQ *Millipore, USA*

3.2 Chromatografické kolony

- Kolona Acclaim 300 C18 *Dionex, USA*
- Kolona Bio-Spin P-30 *Bio-Rad, USA*
- Kolona ENrich™ SEC 70 10 × 300 *Bio-Rad, USA*
- Kolona Superdex 200 HR 100/300 *GE Healthcare, Německo*
- Kolona Superdex 75 HR 10/300 *GE Healthcare, Německo*
- MacroTrap C4 *Michrom, USA*

3.3 Kity

- Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit *Geneaid, Taiwan*
- High-Speed Plasmid Mini Kit *Geneaid, Taiwan*
- Maxiprep Plasmid Kit *Geneaid, Taiwan*

3.4 Chemikálie

- ATTO 590 NHS-ester *Sigma-Aldrich, USA*
- 1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED) *Sigma-Aldrich, USA*
- 4-ethylmorpholin *Sigma-Aldrich, USA*
- Acetonitril *Merck, Německo*
- Agar *Oxoid, USA*
- Agaróza *Serva, Německo*
- Akrylamid *Sigma-Aldrich, USA*
- Ampicilin *Jersey Lab Supply, USA*
- Azid sodný *Sigma-Aldrich, USA*
- Bacto-trypton *Oxoid, USA*
- Bacto-yeast extrakt *Oxoid, USA*
- Bromfenolová modř *Serva, Německo*
- BSA *Sigma-Aldrich, USA*
- Coomassie Brilliant Blue G-250 *Serva, Německo*
- Coomassie Brilliant Blue R-250 *Serva, Německo*
- Cystamin *Sigma-Aldrich, USA*
- Cysteamin *Sigma-Aldrich, USA*
- Činidlo pro stanovení dle Bradfordové *Bio-Rad, Německo*
- Dihydrofosforečnan draselný/sodný *Lach-ner, ČR*

• Disukcinimidylglutarát (DSG)	<i>Pierce Biotechnology, USA</i>
• Disukcinimidylsüberát (DSS)	<i>Pierce Biotechnology, USA</i>
• Dithiosíran sodný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Dithiothreitol (DTT)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• DMSO	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• DNA marker 100 bp, 1 kb	<i>New England Biolabs, USA</i>
• dNTPs	<i>Promega, USA</i>
• Dusičnan stříbrný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Ethanol	<i>Lach-ner, ČR</i>
• Ethidium bromid (EtBr)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Ethylendiamintetraacetát (EDTA)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Ethylmorfolin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Fluoroshield with DAPI F6057-20ML	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Formaldehyd	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Gentamicin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Glycerol	<i>Lach-ner, ČR</i>
• Glycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• GuanidinHCl	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• HEPES	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Hydroxid sodný	<i>Lach-ner, ČR</i>
• Chlorid amonný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Chlorid hořečnatý	<i>Lach-ner, ČR</i>
• Chlorid manganatý	<i>Lach-ner, ČR</i>
• Chlorid rubidný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Chlorid sodný	<i>Lach-ner, ČR</i>
• Chlorid vápenatý	<i>Lach-ner, ČR</i>
• IPTG	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Isopropanol	<i>Lach-ner, ČR</i>
• Jodacetamid (IAA)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Kanamycin (Kan)	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• Kyselina chlorovodíková	<i>Lach-ner, ČR</i>
• Kyselina mravenčí pro LC-MS	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Kyselina octová	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Kyselina trifluoroctová	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• L-Arginin hydrochlorid	<i>Serva, Německo</i>
• L-Glutamin	<i>Gibco, UK</i>

- Markery pro SDS-PAGE
SeeBlue Prestained Protein Standard *Life technologies, USA*
Prestained Protein Marker, Broad Range *New England Biolabs, USA*
 - Médium RPMI 1640 *Gibco, UK*
 - Methanol *Merck, Německo*
 - MOPS *Sigma-Aldrich, USA*
 - N,N'-methylen-bis-akrylamid *Sigma-Aldrich, USA*
 - Octan draselný/sodný *Sigma-Aldrich, USA*
 - Peroxodisíran amonný *Sigma-Aldrich, USA*
 - Sacharóza *Lach-ner, ČR*
 - Sérum FBS *Gibco, UK*
 - Sodiumdodecylsulfát (SDS) *Jersey Lab Supply, USA*
 - Tissue-Tek O.C.T. Compound *Sakura, Nizozemsko*
 - Trimethylamin *Sigma-Aldrich, USA*
 - Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) *Sigma-Aldrich, USA*
 - Tris-HCl *Jersey Lab Supply, USA*
 - Triton X-100 *Sigma-Aldrich, USA*
 - Uhličitan draselný/sodný *Sigma-Aldrich, USA*
 - Voda (LC/MS grade) *J.T.Baker, Indie*
 - β -merkaptoetanol *Sigma-Aldrich, USA*
- Všechny použité chemikálie byly v nejvyšší komerčně dostupné čistotě.

3.5 Enzymy

- AspN *Roche, Švýcarsko*
- *BamHI* *New England Biolabs, USA*
- CIP fosfatáza *New England Biolabs, USA*
- DNAza I *Sigma-Aldrich, USA*
- *EcoRI* *New England Biolabs, USA*
- GluC *Roche, Švýcarsko*
- *HindIII* endonukleáza *New England Biolabs, USA*
- *NdeI* endonukleáza *New England Biolabs, USA*
- RNAza I *Sigma-Aldrich, USA*
- T4 DNA ligáza 1 Weiss *Fermentas, USA*
- Taq platinum DNA polymeráza *New England Biolabs, USA*
- Trypsin *Promega, Švýcarsko*

3.6 Inhibitory proteáz

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

3.7 Primery pro PCR

- **NKR-P1B FW (ligand-vazebná část NKR-P1B):**
5'-GAG ATA TAC ATA TGT CAG TTA ATT TAG A-3'
- **NKR-P1B FW (celá extracelulární část NKR-P1B):**
5'-TCT GTG TCT TGG TGC ATA TGC TAT CAG TAC AA-3'
- **NKR-P1B REV (ligand-vazebná i celá extracelulární část NKR-P1B):**
5'-AGA ACC AGC AAG CTT TCA GGA GTC ATT ACT C-3'

Generi Biotech, Česká republika

3.8 Vektory

- pET-30a(+) *Novagen, USA*
- pEGFPN1 *Shanghai Generay Biotech, Čína*

3.9 Bakteriální kmeny

- **BL21-Gold (DE3)** *E. coli* B F- *ompT hsdS*(rB- mB-) *dcm+* Tetr *gal* λ (DE3) *endA Hte*
Stratagene, USA
- **DH5 α** F- 80*dlacZ* M15 (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-,
mk+) *phoA*supE44 -*thi-1 gyrA96* *relA1* *Stratagene, USA*

3.10 Média

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

3.11 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 gely:** 45% (v/v) metanol; 10% (v/v) kyselina octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- **Bikarbonátový pufr:** 200mM NaHCO₃; pH 8,2

- **Činidlo dle Bradfordové:** komerčně dostupné od firmy *Bio-Rad*, USA
- **Dialyzační pufr:** 15mM Tris-HCl; 9mM NaCl; 1mM NaN₃; pH 8,5
- **Elektrodotový pufr pro SDS elektroforézu:** 10mM Tris-HCl; 250mM glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3
- **Ethylmorfolinový pufr:** 100mM ethylmorfolin
- **Fosfátový pufr:** 10mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄; 2,7mM KCl; 150mM NaCl; pH 7,5 / 7,0 / 6,5
- **Guanidinový pufr pro solubilizaci inkluzních tělísek:** 6M guanidin-HCl; 50mM Tris-HCl; 10mM DTT; pH 8
- **Chromatografický pufr A pro ionexovou chromatografii proteinu NKR-P1B:** 15mM Tris-HCl; 9mM NaCl; 1mM NaN₃; pH 8,5
- **Chromatografický pufr B pro ionexovou chromatografii proteinu NKR-P1B:** 15mM Tris-HCl; 1M NaCl; 1mM NaN₃; pH 8,5
- **Chromatografický pufr pro gelovou filtraci proteinů NKR-P1B:** 10mM HEPES; 50mM NaCl; 1mM NaN₃; pH 7,5
- **Ligační pufr pro T4 DNA ligázu:** komerčně dostupný od firmy *Fermentas*, USA
- **NEB2 pufr:** komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs*, USA
- **NEB3 pufr:** komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs*, USA
- **Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely:** 35% etanol; 10% kyselina octová
- **PCR pufr pro Taq polymerázu:** komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs*, USA
- **Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 50mM Tris-HCl; 100mM NaCl; 1mM 2-merkaptoetanol; 1mM NaN₃; pH 7,4
- **Pufr pro EcoRI:** komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs*, USA
- **Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek:** 50mM Tris-HCl; 100mM NaCl; 1mM 2-merkaptoetanol; 0,5% triton X-100; 1mM NaN₃; pH 7,4
- **Pufr TFB I:** 0,03M KAc; 100mM RbCl; 50mM MnCl₂; 10mM CaCl₂; 15% glycerol; pH 5,8
- **Pufr TFB II:** 10mM MOPS (pH 7,0); 10mM RbCl; 75mM CaCl₂; 15% glycerol; pH 6,8
- **Renaturační pufr pro proteiny NKR-P1B:** 50mM Tris-HCl; 1M L-Arg hydrochlorid; 100mM CaCl₂; 9mM cysteamin; 3mM cystamin; 1mM NaN₃; pH 8,5
- **Sacharózový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 50mM Tris-HCl; 25% sacharóza; 1mM EDTA; 1mM NaN₃; pH 7,4
- **TAE pufr:** 2M Tris-HCl; 1M kyselina octová; 50mM EDTA; pH 8
- **Vzorkový pufr pro DNA elektroforézu:** Gel Loading Dye Blue (6×), komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs*, USA

- **Vzorkový pufr pro SDS elektroforézu neredukující:** 50mM Tris-HCl; 12% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS elektroforézu redukující:** 50mM Tris-HCl; 12% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) bromfenolová modř; 100mM DTT; pH 6,8

4 METODY

Většina níže popsaných metod výroby rekombinantních proteinů je založena na zkušenostech naší laboratoře a na laboratorním manuálu¹²⁰.

Uvedené metody byly použity k přípravě ligand-vazebné a celé extracelulární části proteinu NKR-P1B z myšího kmene BALB/c. Jako předloha pro výrobu jeho ligandu, proteinu Clr-b, sloužila diplomová práce Mgr. Pavla Hanče¹²¹.

4.1 Příprava konstruktů kódujících NKR-P1B

4.1.1 Polymerázová řetězová reakce

DNA konstrukty pro ligand-vazebnou a celou extracelulární část NKR-P1B byly připraveny pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pomocí specifických oligonukleotidů s několikanukleotidovými přesahy z důvodu jejich specifity byly z vektoru pEGFN1 obsahujícího celý gen *Nkr-p1b* (připraven firmou Shanghai Generay Biotech) amplifikovány nukleotidové sekvence kódující pouze ligand-vazebnou a celou extracelulární část proteinu. Mezi tyto přesahy a protein-kodující oblast byla vložena místa pro restriční endonukleázy *NdeI* a *HindIII*.

Oligonukleotidy použité pro PCR reakci uvádí obrázek 4.1, její termální profil tabulka 4.1 a složení PCR směsi tabulka 4.2.

A. Ligand-vazebná část NKR-P1B

NdeI

Forward primer: 5'-GAG ATA TAC ATA TGT CAG TTA ATT TAG A-3'

Reverse primer: 5'-AGA ACC AGC AAG CTT TCA GGA GTC ATT ACT C-3'

HindIII

B. Celá extracelulární část NKR-P1B

NdeI

Forward primer: 5'-TCT GTG TCT TGG TGC ATA TGC TAT CAG TAC AA-3'

Reverse primer: 5'-AGA ACC AGC AAG CTT TCA GGA GTC ATT ACT C-3'

HindIII

Obrázek 4.1: Oligonukleotidy pro amplifikaci genu kódující ligand-vazebnou a celou extracelulární část NKR-P1B.

Barevně jsou označena restriční místa pro endonukleázy *NdeI* a *HindIII*.

Fáze	Teplota	Doba trvání	Počet cyklů
1	94 °C	2 min	1
2	94 °C	30 s	36
	50 °C	30 s	
	72 °C	1 min	
3	72 °C	4 min	1
4	4 °C	-	1

Tabulka 4.1: Termální profil PCR reakce.

Složka	Množství
ddH ₂ O	37,75 µl
PCR pufr pro Taq polymerázu	5 µl
50mM MgCl ₂	1,5 µl
10mM dNTP	1 µl
2,5µM FW primer	4 µl
2,5µM RV primer	4 µl
Templátová DNA (50 ng/µl)	0,5 µl
Taq platinum DNA polymeráza	0,25 µl

Tabulka 4.2: Složení reakční směsi pro PCR.

Délka DNA získané pomocí PCR byla ověřena DNA elektroforézou v 1% agarózovém gelu (popsána v kapitole 4.7.1).

4.1.2 Příprava a ligace amplifikovaného genu do expresního vektoru

Precipitace amplifikované DNA

DNA kódující ligand-vazebnou a celou extracelulární část proteinu NKR-P1B byla po amplifikaci PCR precipitována ethanolem.

Byl přidán 96% ethanol (o objemu 2,5× větším než objem vzorku) s octanem sodným (10 % objemu vzorku), směsi pak byly 30 minut inkubovány v -80 °C a odstředěny 20 minut při 22 000×g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn, vzorky promyty 0,5 ml 70% ethanolu a znovu centrifugovány za stejných podmínek. Ethanol byl opět odebrán, pelety DNA vysušeny pomocí vakuové odparky a nakonec rozpuštěny každá ve 25 µl vody o HPLC čistotě.

Restrikce amplifikované DNA

Dalším krokem bylo štěpení získané DNA restrikčními endonukleázami *NdeI* a *HindIII*. Tímto způsobem byly odstraněny nadbytečné přesahy a vznikla kohezní místa pro ligaci do expresního vektoru pET-30a(+).

K 25 µl vzorku bylo přidáno po 1 µl endonukleáz a 3 µl NEB2 pufru, v němž obě štěpí se 100% účinností. Směsi byly inkubovány 2 hodiny při 37 °C. Následovala DNA elektroforéza v 1% agarózovém gelu a izolace DNA fragmentů pomocí kitu „Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit“ firmy Geneaid.

Ligace získaných fragmentů do expresního vektoru

Ligaci fragmentů do plazmidu pET-30a(+) linearizovaného endonukleázami *NdeI* a *HindIII* předcházela defosforylace plazmidu alkalickou fosfatázou CIP. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 4.3.

Směsi byly umístěny do termostatu na 37 °C na 1 hodinu, poté byla provedena DNA elektroforéza v 1% agarózovém gelu. DNA byla extrahována opět kitem „Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit“.

Ligační směsi, jejichž složení je popsáno v tabulce 4.4, obsahující trojnásobné množství fragmentu oproti defosforylovanému vektoru byly ponechány při laboratorní teplotě přes noc.

Složka	Množství
NEB3 pufr	3 µl
Alkalická fosfatáza CIP	0,5 µl
Vektor (1,6 µg/µl)	17,5 µl

Tabulka 4.3: Složení reakční směsi pro defosforylaci expresního vektoru.

Složka	Množství
Pufr pro T4 DNA ligázu	2 µl
20mM ATP	0,5 µl
Vektor (1 µg/µl)	4,1 µl
Inzert (1 µg/µl)	12,4 µl
T4 DNA ligáza (1 Weiss Unit/µl)	1 µl

Tabulka 4.4: Složení ligační směsi pro ligaci inzertu do expresního vektoru.

Transformace klonovacích kompetentních buněk

Ligační směsi byly dále použity pro transformaci klonovacích buněk DH5α metodou tepelného šoku (příprava kompetentních buněk je popsána v kapitole 4.2).

100 µl buněk bylo rozmrazeno a poté 40 minut inkubováno s 300 ng plazmidové DNA (po celou dobu byly buňky umístěny na ledu). Dále byly buňky vystaveny tepelnému šoku (42 °C po dobu 50 sekund). Poté byly ponechány 1 minutu na ledu a bylo k nim přidáno 800 µl sterilního LB média. Následovala jednodinová inkubace v termostatu při 37 °C.

Buněčné suspenze byly odstředěny při 1 800×g a laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Bylo odebráno 700 µl supernatantu, ve zbytku média byly buňky resuspendovány a asepticky nanесeny na Petriho misky s LB agarem obsahujícím kanamycin o koncentraci 50 µg/ml.

Petriho misky byly inkubovány 13 – 15 hodin při teplotě 37 °C, dokud nebyly pozorovány bakteriální kolonie.

Týmž způsobem byla současně provedena negativní kontrola se stejnými buňkami, které plazmidem transformovány nebyly, a také kontrola pozitivní, kdy byly buňky transformovány původním plazmidem, komerčně připraveným pEGFN1 – NKR-P1B, nesoucím rezistenci na ampicilin (koncentrace ampicilinu v LB agaru činila 150 µg/ml).

Příprava nočních kultur

Vybrané bakteriální kolonie (šest nesoucích plazmid pET-30a(+)) s ligand-vazebnou částí, sedm s celou extracelulární částí NKR-P1B a tři s plazmidem pEGFN1 – NKR-P1B) pak byly inokulovány do 2 ml LB média s příslušnými antibiotiky a kultivovány přes noc při 220 ot./min a 37 °C.

Izolace plazmidové DNA a její ověření restrikční analýzou

Noční kultury byly použity pro izolaci plazmidové DNA pomocí kitu „High-Speed Plasmid Mini Kit“. Ověření přítomnosti požadovaných genů bylo provedeno restrikční analýzou v 1% agarózovém gelu. Složení restrikčních směsí pro oba plazmidy je v tabulkách 4.5 a 4.6 (inzerty kódující ligand-vazebnou a celou extracelulární část proteinu NKR-P1B jsou do plazmidu pET-30a(+) vloženy mezi restrikční místa pro *NdeI* a *HindIII*, do plazmidu pEGFN1 je celý gen *Nkr-p1b* vložen mezi restrikční místa pro *BamHI* a *EcoRI*). Výsledkem restrikční analýzy jsou fragmenty jednak o velikosti samotného linearizovaného plazmidu a pak o velikosti inzertu.

Složka	Množství
Plazmid pET-30a(+)-NKR-P1B	8,4 µl
NEB2 pufr	1 µl
<i>NdeI</i>	0,3 µl
<i>HindIII</i>	0,3 µl

Tabulka 4.5: Složení reakční směsi pro restrikční analýzu plazmidu pET-30a(+)-NKR-P1B.

Složka	Množství
Plazmid pEGFN1 – NKR-P1B	7,4 µl
10× BSA	1 µl
Pufr pro <i>EcoRI</i>	1 µl
<i>EcoRI</i>	0,3 µl
<i>BamHI</i>	0,3 µl

Tabulka 4.6: Složení reakční směsi pro restrikční analýzu plazmidu pEGFN1 – NKR-P1B.

Mezi testovanými nočními kulturami bakterií pak byla dle výsledků vybrána vždy jedna za každý plazmid pro izolaci plazmidové DNA z většího objemu média.

100 μ l kultury bylo přeočkováno do 100 ml čerstvého LB média s antibiotiky. Kultury byly kultivovány opět za stejných podmínek přes noc a byla provedena izolace plazmidové DNA kitem „Maxiprep Plasmid Kit“ firmy Geneaid. Získaná DNA byla precipitována dle návodu kitu a plazmidy pET-30a(+) – NKR-P1B byly testovány restriční analýzou, jež proběhla stejným způsobem popsáným výše. Nakonec byla správnost sekvence konstruktů ověřena DNA sekvenováním ve Středisku sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky.

4.2 Příprava kompetentních buněk

Suspenze kompetentních buněk od firmy Stratagene o objemu 100 μ l byla inokulována do 10 ml sterilního LB média s tetracyklinem o koncentraci 12,5 μ g/ml a ponechána růst přes noc při 220 ot./min a 37 °C.

Druhý den bylo 1,5 ml této noční kultury přeočkováno do 100 ml LB média s tetracyklinem a inkubováno opět při 220 ot./min a 37 °C do OD = 0,8 (λ = 600 nm). Bakteriální kultura byla poté převedena do předem vychlazených centrifugačních kyvet a odstředěna při 3 000 \times g a 4 °C 10 minut. Supernatant byl odstraněn, peleta resuspendována v 15 ml pufru TFB I a inkubována 20 minut na ledu. Poté byla centrifugována za stejných podmínek. Získaná peleta byla resuspendována ve 4 ml pufru TFB II a výsledná suspenze rozdělena po 100 μ l do předchlazených zkumavek. Buňky byly dále inkubovány 2 hodiny při -20 °C a poté na ledu přeneseny do -80 °C.

Pufry TFB I a II, jejichž složení je uvedeno v kapitole 3.11, byly přečištěny filtrací přes membránu s póry o velikosti 0,22 μ m a poté převedeny do sterilizovaných lahví. Byly skladovány při -20 °C a během přípravy kompetentních buněk byly umístěny na ledu.

4.3 Rekombinantní exprese proteinů

K přípravě proteinů byl využit bakteriální expresní systém založený na vysoce aktivní bakteriofágové RNA polymeráze, jež je kódována přímo genomem produkčních buněk *E. coli* kmene *BL21-Gold*. Regulace její exprese je zajištěna prostřednictvím *lac* operonu, za něhož je integrována a který je tlumen produktem konstitutivně aktivního *lacI* genu – *lac* represorem.

Transkripce bakteriofágové RNA polymerázy může být spuštěna analogem laktózy, isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidem (IPTG), jež vyvazuje *lac* represor, čímž je

umožněna aktivace *lac* operonu. Tato RNA polymeráza pak rozpozná T7 promotor, který je součástí expresního vektoru pET-30a(+), a je spuštěna exprese asociovaných genů.

4.3.1 Transformace produkčních kompetentních buněk

K vnesení plasmidové DNA do produkčních kompetentních buněk byla použita metoda transformace tepelným šokem, jež je popsána v kapitole 4.1.2.

Ke 100 μ l rozmražených buněk bylo přidáno 500 ng plasmidové DNA a byla opět provedena negativní kontrola s netransformovanými buňkami.

4.3.2 Selektce produkčního klonu

Selektce produkčního klonu byla provedena jako kontrola exprese požadovaného proteinu produkčními buňkami. Pro tyto účely byly vybrány dvě samostatné kolonie z předchozího kroku za každý protein, byly zaočkovány zvlášť vždy do 2 ml LB média s kanamycinem a ponechány růst přes noc při 220 ot./min a 37 °C.

Vždy dvě zkumavky se 2 ml čerstvého LB média s kanamycinem byly inokulovány tisícinou objemu (2 μ l) z každé bakteriální kultury. Při 220 ot./min a 37 °C byly kultivovány do OD = 0,6 (λ = 550 nm) stanovené spektrofotometricky, kdy byly buňky vždy v jedné ze dvou stejných zkumavek indukovány 0,1mM IPTG a kultivovány dále za stejných podmínek ještě 3 hodiny. Poté byly kultury 10 minut odstředovány při 3 000 \times g a laboratorní teplotě. Získané pelety byly resuspendovány ve 130 μ l vzorkového redukujícího pufru, 5 minut povařeny a znovu stočeny. Vzorky o konečném objemu 20 μ l byly nanесeny na 15% polyakrylamidový gel a analyzovány pomocí SDS elektroforézy. Indukované bakteriální kultury produkující především požadovaný protein byly porovnány s neindukovanými kontrolami.

4.3.3 Optimalizace produkce proteinů

Z důvodu vyšších výtěžků proteinů byly testovány nejvhodnější podmínky exprese zahrnující koncentraci induktoru IPTG, teplotu a délku produkce.

Bylo testováno šest různých koncentrací induktoru. Zkumavky se 2 ml LB média s kanamycinem byly inokulovány 2 μ l produkční kultury a poté, co při 220 ot./min a 37 °C dosáhly OD = 0,6 (λ = 550 nm), byly indukovány následujícími koncentracemi IPTG: 0,05mM; 0,1mM; 0,5mM; 1mM; 3mM a 5mM. Jedna kultura sloužila jako kontrolní a indukována nebyla. Kultivace probíhala další tři hodiny, pak byly kultury odstředěny

(10 minut, 3 000×g, laboratorní teplota) a analyzovány SDS elektroforézou stejně jako v předchozí kapitole 4.3.2.

Pro výběr nejvhodnější teploty pro produkci proteinů byl zvolen stejný postup jako pro výběr optimální koncentrace IPTG. Testované teploty byly 20 °C; 25 °C; 30 °C; 35 °C a 37 °C, ke každé z nich byla provedena negativní kontrola.

Při OD = 0,6 ($\lambda = 550$ nm) byly kultury přeneseny do vybraných teplot a inkubovány dalších 30 minut, aby byly zchlazeny na požadovanou teplotu. Teprve poté byly indukovány takovou koncentrací induktoru, jež se v předešlém kroku ukázala jako nejvýhodnější, tedy 0,1mM IPTG. Po třech hodinách produkce byly kultury opět analyzovány SDS elektroforézou.

Produkce proteinů ve 2 ml LB média s antibiotiky byla sledována po 2, 4, 6, 8, 10 a 24 hodinách od indukce 0,1mM IPTG za vybrané teploty 35 °C. Kultury byly vždy po uplynutí dané doby centrifugovány (10 minut, 3 000×g, laboratorní teplota) a peleta byla uschována do -20 °C, než byla provedena analýza všech vzorků SDS elektroforézou.

4.3.4 Produkce proteinů ve velkém objemu média

Podmínky produkce vybrané při její optimalizaci byly zopakovány v 0,5 l LB média s antibiotiky ve dvoulitrových Erlenmayerových baňkách.

Produkční kultury o objemu 0,5 ml byly zaočkovány do 0,5 l LB média s kanamycinem a po dosažení OD = 0,6 ($\lambda = 550$ nm) byly indukovány IPTG do finální koncentrace 0,1mM. Produkce probíhala po dobu 4 hodin při 35 °C.

Bakteriální suspenze pak byly centrifugovány 10 minut při 5 000×g a 4 °C, a zamrazeny na -80 °C.

4.3.5 Izolace inkluzních tělísek

NKR-P1B je stejně jako jiné proteiny receptorové rodiny NKR-P1, jež jsou v naší laboratoři též připravovány, produkován ve formě inkluzních tělísek (cytoplazmatických agregátů proteinů).

Pelety získané z 0,5 l LB média byly resuspendovány v sacharózovém lyzačním pufru (20 ml pufru / sediment z 0,5 l bakteriální kultury) s inhibitory proteáz (1 μ M leupeptinem a 1mM PMSF). Směsi byly dále třikrát zmrazeny na -80 °C a zase rozmrazeny, mezitím sonikovány po dobu 30 sekund. Poté k nim bylo přidáno 400 μ l 1M roztoku chloridu hořečnatého, 1,5 μ l DNAzy (100 U/ μ l) a 2,5 μ l RNAzy (10 mg/ml).

Směsi se nechaly inkubovat při laboratorní teplotě 30 minut a poté byly odstředěny 10 minut při 15 000×g a 4 °C.

Dále byl sediment sonikací resuspendován ve 20 ml pufru s detergentem, kam byly přidány těže inhibitory proteáz o stejné koncentraci jako v předchozím kroku, a opět centrifugovány za stejných podmínek.

Nakonec byla peleta resuspendována v 10 ml promývacího pufru s inhibitory proteáz, směs odstředěna a finální sediment, teď již tvořený převážně agregovaným rekombinantním proteinem, skladován při -80 °C.

4.3.6 Solubilizace inkluzních tělísek

Izolovaná inkluzní tělíska byla pomocí vortexového mixéru a pipety resuspendována v denaturačním guanidinovém pufru (8 ml pufru / 1g inkluzních tělísek) s leupeptinem o finální koncentraci 1µM. Za občasných sonikací pak byla inkubována 1 hodinu na vodní lázni zahřáté na 40 °C, aby se zcela rozpustila.

V dalším kroku byl roztok odstředěn 30 minut při 185 000×g a 20 °C na ultracentrifuze a výsledný supernatant ihned použit k renaturaci proteinu popsané níže.

4.4 Renaturace proteinů

K renaturaci proteinů byla použita metoda tzv. rychlého naředění, kdy je roztok denaturovaného proteinu při teplotě 4 °C pomalu přikapáván do 100× většího objemu renaturačního pufru obsahujícího vysokou koncentraci nízkomolekulárních chaperonů, jako je L-arginin. Na správné sbalení proteinu, neboli renaturaci, má kromě koncentrace chaperonu vliv také iontová síla pufru, jeho pH a poměr složek redoxního systému (cystamin / cysteamin nebo oxidovaná / redukováná forma glutathionu).

Oxidující a redukující složky redoxního systému nejsou v renaturačním pufru ve stejném poměru z důvodu působení 10 mM DTT, který je součástí guanidinového pufru, v němž se protein před renaturací nachází. DTT redukuje cystamin na cysteamin / disulfidické můstky mezi molekulami glutathionu a mění tak původní redoxní prostředí renaturačního pufru. Výsledný poměr složek redox systému (redukující k oxidující) je pak 3:1.

4.4.1 Optimalizace renaturace proteinů NKR-P1B

Renaturace obou forem proteinu NKR-P1B byla testována ve čtyřech podmínkách lišících se pH, redoxním systémem a koncentrací proteinu přidávaného do renaturačního pufru. Složení jednotlivých pufrů je uvedeno v tabulce 4.7.

Pufry byly připraveny tak, aby byl jejich objem stonásobný oproti objemu přidávaného roztoku proteinu (2 ml roztoku proteinu do 200 ml renaturačního pufru). Byly umístěny do chladové místnosti o 4 °C a těsně před začátkem renaturace doplněny o PMSF (do finální koncentrace 1mM).

	A / C		B		D	
Tris-HCl	50mM					
L-Arg	1M					
CaCl₂	100mM					
NaN₃	1mM					
redox systém	cystamin	3mM	GSSG	3mM	cystamin	3mM
	cysteamin	9mM	GSH	9mM	cysteamin	9mM
pH	8,5		8,5		9	

Tabulka 4.7: Složení renaturačních pufrů označených A – D.

Podmínka C se lišila od A koncentrací proteinu přidávaného do renaturačního pufru (roztok proteinu byl 5× zředěn oproti podmínce A). GSH značí redukovanou formu glutathionu, GSSG oxidovanou.

Roztok proteinu byl do pufru přikapáván za stálého míchání vždy rychlostí asi 1 kapka za sekundu. Pufry se následně nechaly za stejných podmínek míchat další hodinu.

Poté byly jednotlivé roztoky přeneseny do dialyzačních střev a 4 hodiny dialyzovány v chladové místnosti proti 8 litrům dialyzačního pufru. Proces byl zopakován ještě jednou s čerstvým dialyzačním pufrem a prodloužen na 14 – 16 hodin.

Nejvýhodnější renaturační podmínka byla nalezena pomocí gelové filtrace (princip metody je popsán v kapitole 4.6) na koloně Superdex 75 HR 10/300, kdy byl porovnáván především poměr mezi množstvím získaného čistého proteinu a množstvím agregátů.

4.4.2 Velkoobjemová renaturace proteinů

Postup popsaný v předchozí kapitole byl zopakován s nejvýhodnější renaturační podmínkou – celý objem roztoku proteinu v guanidinovém pufru (8 ml) byl přidáván do stonásobného objemu jednoho renaturačního pufru (800 ml) a stejným způsobem dialyzován.

4.5 Metody pro zakoncentrování roztoku proteinu

4.5.1 Ultrafiltrace

Po dialýze byl objem vzorku snížen přibližně na 30 ml pomocí ultrafiltrace, kdy byl roztok proteinu filtrován přes celulóзовou membránu s propustností do 10 kDa.

Po sestavení a naplnění ultrafiltrační aparatury roztokem proteinu byla cela připojena k tlakové láhvi s inertním plynem (dusíkem) a roztok za pomalého míchání při laboratorní teplotě zahušťován přes membránu pod tlakem 0,3 MPa.

4.5.2 Centrifugační koncentrátoři

Pokud bylo třeba objem vzorku ještě snížit, byly použity centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra, též s limitem 10 kDa.

Roztok o objemu 15 ml byl zahušťován na objem maximálně 500 μ l při 4 000 \times g a laboratorní teplotě 15 až 20 minut.

4.6 Gelová filtrace

Pro purifikaci rekombinantních proteinů byla využívána chromatografická metoda, a to gelová filtrace. Separace byla prováděna na přístroji NGC Quest™ 10 Chromatography System firmy Bio-Rad, který umožňuje sledovat eluci proteinů fotometrickým detektorem při vlnové délce 280 nm.

Metoda gelové filtrace slouží k dělení molekul podle jejich velikosti a tvaru. Větší molekuly procházejí kolonou rychleji, zatímco menší molekuly pronikají do pórů částic tvořících náplň kolony, čímž je jejich průchod zpomalován.

Proteiny byly separovány na kolonách Superdex 75 HR 10/300 nebo ENrich™ SEC 70 10 \times 300 při průtoku 0,4 ml/min.

4.7 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue G-250, které se váže na bazické a aromatické aminokyseliny. Vazba způsobuje posun absorpčního maxima tohoto barviva z 365 nm na 595 nm, a tudíž modré zbarvení roztoku.

Pro stanovení koncentrace je třeba připravit řadu standardů o definované koncentraci (0 až 0,5 mg/ml). Z naměřených absorbancí je pak po odečtení negativní kontroly (samotné činidlo s barvivem) vytvořena kalibrační křivka a rovnice regrese, podle níž je pak vypočítána koncentrace vzorků dle jejich absorbance.

Standardy a vzorky jsou zpravidla měřeny v tripletech z důvodu snížení chyby způsobené pipetováním.

Sada šesti standardů a vzorky byly v tripletech po 5 μ l napipetovány do 96 jamkové destičky a doplněny 200 μ l činidla dle Bradfordové. Po 5 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla absorbance roztoků změřena na přístroji Safire².

4.8 Elektromigrační metody

4.8.1 DNA elektroforéza v agarózovém gelu

Separace DNA probíhá na základě migrace záporně nabitých fosfátů k anodě v agarózovém gelu. Koncentrace agarózy je volena podle velikosti dělených fragmentů. Součástí gelu je ethidium bromid, jenž se interkaluje mezi báze DNA a pod ultrafialovým světlem fragmenty zviditelňuje. Jejich správnou velikost lze určit porovnáním se standardem pouze za předpokladu, že k analýze byla použita lineární DNA, která nezaujímá strukturu superhelixu (z angl. „*supercoiled*“) typickou pro cirkulární plazmidy.

Pro identifikaci linearizovaného vektoru pET-30a(+) a fragmentů NKR-P1B byl připraven 1% agarózový gel, kdy bylo 0,5 g agarózy povařením rozpuštěno v 50 ml TAE pufru. Po vychladnutí bylo přidáno 2,5 μ l ethidium bromidu, směs pak byla nalita do vaničky pro gel a byl do ní umístěn hřeben pro vytvoření jamek. Po zatuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické aparatury a převrstven TAE puftrem. Separace probíhala při napětí 10 V/cm.

Příprava vzorků

Vzorky pro DNA elektroforézu byly připravovány o celkovém objemu 12 μ l, kdy byly k 10 μ l roztoku DNA přidány 2 μ l 6 \times koncentrovaného vzorkového pufru (Gel Loading Dye Blue (6 \times) firmy New England Biolabs).

4.8.2 Diskontinuální SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Proteiny jsou v polyakrylamidovém gelu separovány v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), který proteiny denaturuje a obalí, čímž jim poskytne záporný náboj. Počet navázaných molekul SDS je přímo úměrný délce daného proteinu. Separace proteinů je tedy závislá především na jejich molekulové hmotnosti, je ale také ovlivněna mírou denaturace nebo posttraslačními modifikacemi.

Dělicí gel byl vzhledem k velikosti proteinů NKR-P1B i Clr-b připravován 15%. Přesné složení gelů je popsáno v tabulce 4.8.

Složka	5% zaostřovací gel [ml]	15% dělicí gel [ml]
H ₂ O	0,68	1,1
30% akrylamidová směs*	0,17	2,5
1,5M Tris-HCl o pH 8,8	-	1,3
1M Tris-HCl o pH 6,8	0,13	-
10% SDS	0,01	0,05
10% APS	0,01	0,05
TEMED	0,001	0,002

Tabulka 4.8: Složení 5% zaostřovacího a 15% dělicího polyakrylamidového gelu.

**30% akrylamidová směs obsahuje 4M akrylamid a 65mM N, N'-methylen-bis-akrylamid*

Nejprve byl mezi elektroforetická skla nanesen 15% dělicí gel a převrstven vodou, aby bylo zamezeno přístupu vzduchu a mohlo dojít k polymeraci. Následně byla voda odstraněna a nahrazena 5% zaostřovacím gelem, do něhož byl zasazen hřeben. Po zatuhnutí gelu byl hřeben odstraněn, byla sestavena elektroforetická aparatura, naplněna elektrodovým pufrem a nanášeny vzorky. Napětí pro separaci bylo nastaveno

na 21 V/cm. Poté, co čelo elektroforézy opustilo gel, proces byl zastaven, gely ihned fixovány a obarveny způsobem popsáním níže.

Příprava vzorků

Způsob přípravy vzorků pro SDS elektroforézu se liší v závislosti na tom, zda má jejich analýza proběhnout v redukujícím či neredukujícím prostředí a zda je zpracováván pevný vzorek (buněčná peleta), či vzorek kapalný (například frakce po gelové filtraci).

Pelety z 1 ml bakteriální kultury byly vždy resuspendovány ve 130 μ l 1 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS elektroforézu se 100mM DTT. K 10 μ l kapalných vzorků bylo přidáváno 10 μ l 2 \times koncentrovaného vzorkového pufru s 200mM DTT. Tyto vzorky určené pro kontrolu proteinů za redukujících podmínek pak byly 5 minut povařeny.

Kapalné vzorky o objemu 10 μ l určené k analýze za neredukujících podmínek byly smíchány s 10 μ l neredukujícího vzorkového pufru bez DTT.

Před elektroforézou byly všechny vzorky 5 minut centrifugovány při 10 000 \times g a laboratorní teplotě. Objem vzorků nanášených do jamek gelu činil maximálně 20 μ l.

Barvení SDS-PAGE gelů

Gely byly fixovány a barveny 15 minut v barvicím roztoku obsahujícím Coomassie Brilliant Blue R-250 a poté odbarvovány v odbarvovacím roztoku přes noc.

Jestliže množství analyzovaných proteinů bylo příliš nízké pro vizualizaci pomocí barvicího roztoku, bylo provedeno stříbření gelů, a to podle postupu popsaného v tabulce 4.9.

Krok	Roztok	Délka kroku
1	Odbarvovací roztok	3 × 30 min
2	20% EtOH	10 min
3	H ₂ O	10 min
4	0,2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃	1 min
5	H ₂ O	2 × 20 sec
6	2 g/l AgNO ₃	30 min
7	H ₂ O	10 sec
8	0,7 ml/l formaldehydu; 30 g/l K ₂ CO ₃ ; 10 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃	2 – 4 min*
9	50 g/l Tris-HCl; 25% HOAc	1 min

Tabulka 4.9: Postup vizualizace proteinů v gelu stříbrem.

*délka kroku závisí na požadovaném stupni zbarvení proteinů

SDS elektroforéza byla prováděna vždy v případě potřeby kontroly proteinů během jednotlivých kroků produkce, renaturace a purifikace. Byla sledována molekulová hmotnost proteinu, čistota (množství dalších proteinů) a kvalita frakcí (tendence proteinu NKR-P1B agregovat či hydrolyzovat).

4.9 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (*Mass Spectrometry*, MS) má v oblasti biologie široké využití. Umožňuje identifikovat proteiny (stanovit jejich přesnou molekulovou hmotnost, určit aminokyselinovou sekvenci, zapojení disulfidických můstků a posttranslační nebo chemické modifikace). Dále lze pomocí MS v kombinaci například s chemickým zesíťením či vodík/deuteriovou výměnou (*H/D exchange*) studovat strukturu proteinů i proteinových komplexů.

MS techniky lze využít i pro identifikaci bakterií, zobrazování povrchů tkání pro sledování distribuce molekul (tzv. *MS imaging*), pro detekci mutací v DNA, a pro mnoho dalších účelů.

Hmotnostní spektrometr se skládá ze čtyř základních částí: iontového zdroje, analyzátoru, detektoru a řídicího počítače.

Aby mohly být molekuly analyzovány, musí být převedeny na ionty v plynné fázi, které jsou usměrňovány do analyzátoru. Pro měření celých proteinů jsou využívány

měkké ionizační techniky, mezi něž patří ionizace elektrosprejem (*Electrospray Ionization*, ESI) nebo ionizace laserem za přítomnosti matrice (*Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization*, MALDI).

Hmotnostní analyzátor je schopen rozlišovat ionty na základě jejich efektivní hmotnosti, tedy poměru hmoty a náboje (m/z). Přístroj FT ICR SolariX XR™ používaný naší laboratoří využívá iontovou cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací (*Fourier Transform – Ion Cyclotron Resonance*, FT-ICR) a jeho detekční limit dosahuje látkového množství až 10^{-17} mol analytu.

MS techniky byly využity pro stanovení přesné molekulové hmotnosti proteinů NKR-P1B, dále pro identifikaci disulfidických můstků a analýzu prostorové struktury pomocí chemického zesílení, kdy bylo využito kombinace chromatografické separace s MS. Separace byla provedena na koloně s reverzní fází (s polymerním uhlovodíkovým řetězcem o 18 uhlících) *Acclaim 300 C18*, jež dělí peptidy na základě jejich hydrofobicity, a která byla přímo spojena s hmotnostním spektrometrem.

Veškerá měření na hmotnostním spektrometru byla provedena RNDr. Hynkem Mrázkem, Ph.D.

4.9.1 Odsolení proteinu a stanovení jeho molekulové hmotnosti

Před měřením přesné molekulové hmotnosti nativního proteinu NKR-P1B pomocí ESI-FT-ICR MS byl vzorek zbaven solí na koloně MacroTrap C4 s reverzní fází. Postup je uveden v tabulce 4.10.

Krok	Roztok	Objem roztoku
1. Okyselení vzorku	0,5% FA	doplněno na 200 μ l
2. Promytí kolony	80% AcN, 0,5% FA	150 μ l
3. Ekvilibrace kolony	0,5 % FA	100 μ l
4. Nanesení a promytí vzorku	0,5% FA	500 μ l
6. Eluce proteinu	80% AcN, 0,5% FA	200 μ l

Tabulka 4.10: Postup pro odsolení proteinového vzorku pomocí kolony MacroTrap C4.

FA značí kyselinu mravenčí (formic acid) a AcN acetonitril.

4.9.2 Identifikace disulfidických můstků v proteinech

U sekretovaných a membránových proteinů dochází vlivem oxidačního prostředí k tvorbě kovalentně spojených thiolových skupin cysteinů. Vznikají disulfidické můstky, které se významně podílejí na utváření výsledné terciární a kvartérní struktury proteinů. Informace o zapojení těchto vazeb v proteinech NKR-P1B přispívá k řešení jejich struktury.

SDS elektroforéza v přítomnosti cystaminu

Aby nedošlo k porušení disulfidických vazeb během dělení proteinů v polyakrylamidovém gelu, probíhala SDS elektroforéza za neredukujících podmínek (s přidavkem oxidačního činidla cystaminu o koncentraci 100 μ M do neredukujícího vzorkového pufru a do elektrodového pufru).

K analýze bylo použito celkem 20 μ g proteinu a separace probíhala za nízkého napětí (17 V/cm). Gel byl poté obarven Coomassie Brilliant Blue R-250 a odbarven v odbarvovacím roztoku.

Štěpení proteinů v gelu

Místa obsahující proteiny byla z gelu skalpelem vyřezána, rozkrájena na přibližně stejně velké kostičky (cca 1 mm³) a přenesena do čistých zkumavek.

Gel byl dále odbarvován sonikací ve směsi ethylmorfolinového pufru s přidavkem 300 μ M cystaminu a acetonitrilu (AcN) v poměru 1:1 (o celkovém objemu cca 30 μ l). Směs byla několikrát vyměněna, dokud nebyl gel zcela bezbarvý a nakonec odstraněna.

Následně byl gel vysušen pětiminutovou sonikací ve 30 μ l AcN. Ten byl pak odstraněn a bylo přidáno 30 μ l ethylmorfolinového pufru, v němž byl gel též 5 minut sonikován. Tento proces byl zopakován 3 \times , poté byl gel vysušen na vakuové odparce.

Pro stanovení zapojení disulfidických vazeb je ideální protein štěpit tak, aby vzniklé peptidy obsahovaly maximálně jeden cystein. Z toho důvodu byly vybrány dvě proteázy: trypsin (který štěpí na C-konci lysinu a argininu) a AspN (štěpící na N-konci před kyselinou asparagovou). Pro celou extracelulární část proteinu byla použita ještě třetí proteáza, GluC, štěpící na C-konci kyseliny glutamové.

K vysušenému gelu bylo přidáno 50 μ l 10% AcN v ethylmorfolinovém pufru s 300 μ M cystaminem a příslušnou proteázou (trypsin do finální koncentrace 20 ng/ μ l, AspN

do koncentrace 4 ng/ μ l a GluC do koncentrace 1,7 ng/ μ l). Směsi byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Extrakce peptidů z gelu

Proteázy byly po této inkubaci inaktivovány 1% kyselinou mravenčí (FA). Poté byla směs ze zkumavek odebrána do nových zkumavek, kam byly přidávány i další extrakty: vždy 30 μ l AcN a 30 μ l 0,5% FA, v nichž byl gel střídavě 5 minut sonikován.

Extrakce peptidů z gelu byla provedena pomocí sonikace, která probíhala nejprve s AcN a poté s FA, a byla zopakována 3×. Nakonec byly extrahované směsi odpařeny na vakuové odparce.

Měření na hmotnostním spektrometru

Před samotným měřením byly peptidy ve zkumavkách rozpuštěny v 10 μ l 0,5% FA. Vzorky byly analyzovány metodou LC-MS. Peptidy byly separovány na koloně s reverzní fází *Acclaim 300 C18*, která byla přímo napojena na elektrosprej hmotnostního spektrometru.

Získaná data byla vyhodnocena programem *Data Analysis 4.1* firmy Bruker Daltonics. Pomocí vhodné metody byly všechny peptidové signály ve všech částech chromatogramu exportovány do textového souboru, který sloužil jako vstup pro program *Links* používaný pro analýzu peptidů spojených disulfidickým můstkem. Program *Links* hledá na základě známé sekvence proteinu a použité specifické proteázy experimentální hmoty, které odpovídají teoretickým hmotám takto spojených peptidů v rámci intervalu spolehlivosti měření.

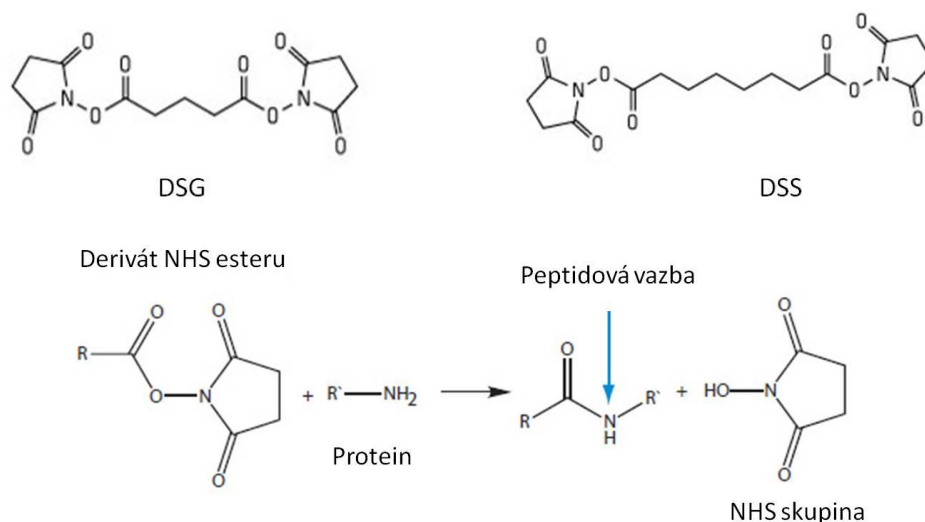
4.9.3 Chemické zesítnění proteinů NKR-P1B

Metoda chemického zesítnění poskytuje informaci o struktuře proteinu či proteinového komplexu, a to za fyziologických podmínek. Molekuly homo- či heterobifunkčních činidel o definované délce specificky váží konkrétní aminokyseliny, které dokážou vzájemně propojit, nachází-li se ve struktuře proteinu dostatečně blízko sebe¹²².

Pro zesítnění proteinu NKR-P1B byla použita homobifunkční činidla, deriváty *N*-hydroxysukcinimid (NHS) esteru, která váží aminoskupiny na postranním řetězci lysinu nebo *N*-terminální konec proteinu: disukcinimidyl glutarát (DSG) a disukcinimidyl suberát (DSS). Pro snadnější ověření zesítnění daných peptidů byly použity také deuterované formy těchto činidel (deuterium způsobí posun

v hmotnostním spektru rovný hmotě jednoho neutronu navíc oproti vodíku, takže by měly být ve spektru pozorovány spojené peptidy vždy dvakrát).

Chemické vzorce činidel a průběh reakce zesíťení jsou uvedeny na obrázku 4.3, údaje týkající se maximální možné vzdálenosti mezi Ca aminokyselin modifikovaných těmito činidly jsou popsány v tabulce 4.11.



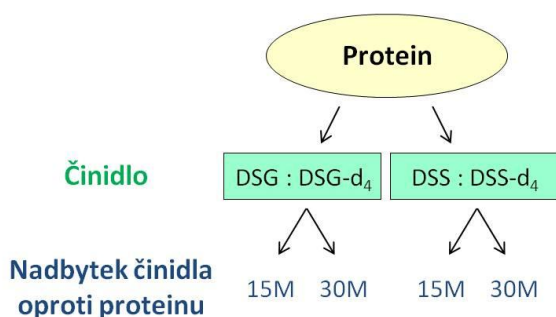
Obrázek 4.3: Chemické vzorce použitých síťovacích činidel a průběh reakce zesíťení.

Činidlo	Délka raménka molekuly	Max. vzdálenost mezi Ca modifikovaných aminokyselin
DSG	7,7 Å	20,0 Å
DSS	11,4 Å	24,0 Å

Tabulka 4.11: Délka ramének molekul síťovacích činidel a maximální vzdálenost mezi uhlíky Ca modifikovaných aminokyselin.

Pro každou ze síťovacích reakcí bylo použito 10 μg proteinu o objemu 10 μl v pufru obsahujícím 10mM HEPES a 50mM NaCl (pH bylo upraveno na 7,5), do kterého byly proteiny převedeny pomocí kolony *Bio-Spin P-30*.

Proběhly celkem 4 reakce, jak je popsáno na obrázku 4.4. Takto namíchané reakční směsi o objemu cca 11 μl byly 3 hodiny inkubovány při laboratorní teplotě.



Obrázek 4.4: Schéma provedených síťovacích reakcí.

Byla použita dvě síťovací činidla. Každé v kombinaci se svou deuterovanou formou (v poměru 1:1), a v 15molárním a 30molárním nadbytku oproti proteinu NKR-P1B.

Štěpení proteinů v gelu

Po inkubaci byla provedena SDS elektroforéza, jak je uvedeno v kapitole 4.8.2. Ke vzorkům bylo přidáno po 10 μ l 2 \times koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru, byly 5 minut povařeny, odstředěny, a naneseny na 15% polyakrylamidový gel. Další postup zpracování gelu je podobný postupu v předchozí kapitole 4.9.2.

Poté, co byl gel obarven v barvicím roztoku a odbarven v odbarvovacím roztoku, zóny obsahující proteiny byly z gelu vyřezány a nakrájeny na kostičky. Pomocí sonikace byl gel dále odbarvován v ethylmorfolinovém pufru s AcN (poměr složek 1:1) o objemu 30 μ l. Směs byla odstraněna a bylo přidáno 30 μ l AcN. Gel byl promíchán na vortexovém mixéru a AcN odstraněn.

Jako redukční činidlo byl použit tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) v ethylmorfolinovém pufru o koncentraci 50mM a celkovém objemu 30 μ l. Směs byla po dobu 10 minut inkubována při teplotě 90 °C. Následně byla odstraněna a ke gelu bylo 2 \times přidáno a opět odebráno 30 μ l AcN.

Pro zabránění reoxidace disulfidických vazeb bylo použito alkylační činidlo, 50 μ l 50mM iodacetamidu v ethylmorfolinovém pufru. Gel byl s tímto roztokem inkubován 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě.

Následně byl gel stejně jako v předchozí kapitole 3 \times promyt pětiminutovou sonikací postupně ve 30 μ l AcN a ve 30 μ l ethylmorfolinového pufru, a vysušen na vakuové odparce.

K vysušenému gelu bylo přidáno 50 μ l 10% AcN v 10mM ethylmorfolinovém pufru s trypsinem o koncentraci 20 ng/ μ l. Směs byla inkubována přes noc při 37 °C.

Extrakce peptidů z gelu a měření na hmotnostním spektrometru

Peptidy byly extrahovány z gelu a měřeny na hmotnostním spektrometru stejným způsobem, jak je popsáno v kapitole 4.9.2.

Program *Links* byl tentokrát použit pro analýzu chemicky zesíťených peptidů. Na základě známé sekvence proteinu, použité specifické proteázy a znalosti hmotnostního přírůstku jednotlivých síťovacích činidel identifikoval hmoty, které odpovídají jednotlivým zesíťeným peptidům.

4.9.4 Model proteinů NKR-P1B

Na základě výsledků získaných identifikací disulfidických můstků a chemickým zesíťením, a na základě homologie s proteinem NKR-P1A (GI: 200059) z myšního kmene B6 (jehož struktura pomocí rentgenostrukturní analýzy a MS technik byla v naší laboratoři rozřešena Mgr. Danielem Rozbeským, Ph.D.¹⁰⁹), byly vytvořeny Mgr. Zdeňkem Kukačkou v programu *Modeller* modely obou forem proteinu NKR-P1B. Ligand-vazebná část proteinu NKR-P1B se shoduje v aminokyselinové sekvenci s proteinem NKR-P1A z 84 %, celá extracelulární část ze 79 %.

4.10 Biochemické metody testování interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b

Interakce proteinů NKR-P1B (jak ligand-vazebné, tak monomerní a dimerní formy celé extracelulární části) a Clr-b byly v rámci této diplomové práce testovány gelovou filtrací a povrchovou plazmonovou rezonancí.

4.10.1 Gelová filtrace

Analýza interakce proteinů metodou gelové filtrace, jejíž princip je popsán v kapitole 4.6, byla ověřována na koloně ENrich™ SEC 70 10 × 300.

Proteiny NKR-P1B (ligand-vazebná část proteinu, monomerní a dimerní forma celé jeho extracelulární části) a Clr-b byly pomocí kolon *Bio-Spin P-30* převedeny kvůli simulaci fyziologického prostředí do fosfátového pufru. Interakce proteinů by dle literatury měla probíhat za nepatologických podmínek (receptor NKR-P1B je inhibiční). V organismu však v důsledku zánětu dochází k poklesu pH, které by na vazbu mohlo mít vliv, a v rámci diplomové práce Mgr. Pavla Hanče byla zjištěna slabá interakce proteinů NKR-P1D a Clr-b za sníženého pH¹²¹. Proto byly testovány tři hodnoty pH fosfátového pufru: 7,5; 7,0 a 6,5.

NKR-P1B a Clr-b byly poté smíchány v molárním poměru 1:1, směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě a nanášena na kolonu. Pro eluci proteinů byl použit stejný pufr, do něhož byly před gelovou filtrací proteiny převedeny.

4.10.2 Povrchová plazmonová rezonance

Povrchová plazmonová rezonance je optická metoda využívající rezonanční excitaci povrchových plazmonů (hromadně excitovaných elektronů, které se nacházejí na rozhraní mezi vodičem a izolantem). Plazmony vznikají při interakci polarizovaného světla s tenkou vrstvou kovu na rozhraní dvou prostředí o různém indexu lomu za podmínek úplného odrazu světla. Při takovém odrazu se vytvoří zhášivá vlna, jež je pohlcena povrchovými plazmony kovové vrstvy. To vede ke vzniku plazmonové vlny, která způsobuje pokles intenzity odraženého světla.

Při analýze interakcí biomolekul je jeden z vazebných partnerů imobilizován na povrch senzoru (v našem případě destička pokrytá tenkou vrstvou zlata), druhý vazebný partner protéká okolo rozpuštěný ve vhodném pufru. Tvorba či disociace komplexu je doprovázena změnou indexu lomu světla, tedy změnou rezonančního úhlu, která je přímo úměrná množství analytu.

Výhodou této metody je vysoká citlivost a schopnost zaznamenat interakce v reálném čase. Podle průběhu experimentu lze určit vazebné nebo disociační konstanty analytu a kinetiku interakce.

Vazba proteinů NKR-P1B a Clr-b byla testována opět v prostředí fosfátového pufru a tří různých hodnot pH. Interakce byla ověřována jak za imobilizace proteinu Clr-b na povrch senzoru, tak proteinů NKR-P1B, aby byla zvýšena pravděpodobnost interakce (vazbou na senzor by mohlo dojít ke skrytí vazebného místa některého z proteinů).

Měření byla provedena Mgr. Ladislavem Bumbou, Ph.D.

4.11 Biologické metody testování interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b

Vzhledem k rozsáhlé expresi proteinu Clr-b v organismu (viz kapitola 1.6.2) byla testována jeho interakce s fluorescenčně značeným NKR-P1B na tkáňových řezech a na myších buňkách kostní dřeně.

K experimentům byla použita myš kmene 129/Sv, u níž byl nahrazen β -řetězec MHC glykoproteinů II. třídy genem kódujícím β -řetězec MHC glykoproteinů II. třídy fúzovaný s GFP (*Green Fluorescent Protein*).

Buňky kostní dřeně byly kultivovány Janou Dvořákovou. Tkáňové řezy byly připraveny a značení buněk rekombinantními proteiny NKR-P1B bylo provedeno ve spolupráci s Mgr. Valérií Grobárovou, Ph.D. Focení preparátů probíhalo

na fluorescenčním mikroskopu Cell R. Úprava a vyhodnocení získaných dat pomocí programů *ImageJ 1.48v* a *Fiji*¹²³ bylo provedeno podle Mgr. Ondřeje Šebesty. Experimenty byly navrženy RNDr. Petrem Novákem, Ph.D. a Doc. RNDr. Janem Černým, Ph.D. a uskutečněny v laboratoři Buněčné imunologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

4.11.1 Fluorescenční značení proteinů NKR-P1B

Ke značení proteinů byla použita amino-reaktivní sonda ATTO 590 NHS-ester, která reaguje s aminoskupinami lysinu. Optimální pH pro reakci je mezi 8 – 9, při němž je aminoskupina lysinu silně deprotonovaná, a tudíž velmi reaktivní.

Ve 100 μ l bezvodého dimethylsulfoxidu (DMSO) byl rozpuštěn 1 mg fluorescenční sondy. Vždy 200 μ g proteinu (ligand-vazebná část NKR-P1B, dimerní a monomerní forma celé extracelulární části NKR-P1B) bylo převedeno pomocí gelové filtrace na koloně *Bio-Spin P-30* do sodium bikarbonátového pufru o pH 8,2. K roztoku proteinu pak byla přidána fluorescenční sonda v molárním poměru 1:5 (protein:sonda) a směs byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě ve tmě.

Fluorescenční sonda, která se nenavázala na protein, byla odstraněna od značeného proteinu několika krokovou gelovou filtrací (opět na koloně *Bio-Spin P-30*). Značený protein byl nakonec převeden do fosfátového pufru o pH 7,5.

K následujícím experimentům byly vybrány tyto koncentrace proteinů: 0,1 μ g/ml a 1 μ g/ml.

4.11.2 Příprava a značení tkáňových řezů rekombinantními proteiny NKR-P1B s fluorescenční sondou

Z myši byla vypreparována slezina, thymus a uzlina. Byly promyty fosfátovým puftrem (pH 7,4) a 3 – 4 hodiny fixovány ve 3,8% formaldehydu při laboratorní teplotě. Tkáně byly poté znovu promyty a při 4 °C uchovány ve 20% sacharóze přes noc. Nakonec byly zmrazeny ve směsi Tissue-Tek O.C.T Compound, nakrájeny na kryostatu Leica CM350 S na řezy o tloušťce 10 μ m a uchovávány v -80 °C, než bylo přistoupeno ke fluorescenčnímu značení.

Tkáňové řezy byly permeabilizovány v roztoku 0,5% Tritonu X-100 2 – 3 minuty, poté 3 \times promyty fosfátovým puftrem a vyblokovány 1% roztokem BSA, v němž byly inkubovány 10 minut. Následně byly preparáty inkubovány s fluorescenčně značenými

rekombinantními proteiny NKR-P1B o koncentraci 0,1 µg/ml a 1 µg/ml 1 hodinu při laboratorní teplotě a 5× promyty fosfátovým pufrém. Kryořezy byly nakonec převrstveny médiem Fluoroshield obsahujícím DAPI, překryty krycím sklíčkem a pozorovány prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu.

4.11.3 Příprava a značení buněk kostní dřeně rekombinantními proteiny NKR-P1B s fluorescenční sondou

Buňky kostní dřeně získané z femuru myši byly kultivovány v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂) na krycích sklíčkách na dně jamek ve 24-jamkové destičce. Kultivační médium RPMI bylo obohaceno o 2mM L-Glutamin, 10% FBS sérum, 0,2% roztok Na₂CO₃ a gentamicin o koncentraci 50 µg/ml.

Druhý den kultivace byl do média přidán GM-CSF, který stimuluje buňky kostní dřeně k diferenciaci v granulocyty (neutrofilly, bazofily, eosinofily) a monocyty. Pátý den od začátku kultivace byl (po kontrole stupně diferenciaci buněk pomocí mikroskopu) proveden experiment.

Z jamek destičky byl odebrán supernatant, buňky byly promyty fosfátovým pufrém a 20 minut fixovány ve 3,8% formaldehydu. Aby byl formaldehyd řádně odstraněn, buňky byly inkubovány 10 minut s 15mM roztokem NH₄Cl. Poté byly ještě 3× promyty fosfátovým pufrém. Všechny kroky přípravy buněk probíhaly při laboratorní teplotě.

Další postup zahrnující permeabilizaci a značení buněk je analogický s předchozí kapitolou.

Výsledky značení tkáňových řezů a buněk kostní dřeně byly vztaženy k negativní (preparáty, k nimž nebyl přidán značený protein NKR-P1B) a pozitivní kontrole (buňky značené *peanut* lektinem o výsledné koncentraci 2 µg/ml). *Peanut* lektin aglutinin se váže na D-galaktosylové zbytky glykosylovaných membránových proteinů¹²⁴.

5 VÝSLEDKY

5.1 Úvod k výsledkům

Aminokyselinové sekvence exprimovaných částí proteinu NKR-P1B (ligand-vazebná a celá extracelulární část) z myšího kmene BALB/c (GI:82395316) uvedené na obrázku 5.1 jsou vyznačeny podtržením. Protein Clr-b (GI:347803162) je označen na obrázku 5.2. Jednotlivé domény proteinů jsou vyznačeny dle informací databáze *Universal Protein Resource* (UniProt).

A. Ligand-vazebná část NKR-P1B

MDSTTLVYADLNLRARIQEPKHDSPPSLSPDTCRCPRWHLRALKFGCAGLILLVVLVIGLCVLVLSVQKSS
 VQKICADVQENRTHHTDMSVNLECPQDWLSHRDKCFRVFQVSNTWEEGQADCGRKGATLLLIQDQ
EELRFLDSIKEKYNSFWIGLRFTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKITGDTENGSCASISGDKVTSESCST
DNRWICQKELNHETPSNDS

B. Celá extracelulární část NKR-P1B

MDSTTLVYADLNLRARIQEPKHDSPPSLSPDTCRCPRWHLRALKFGCAGLILLVVLVIGLCVLVLSVQKSS
 VQKICADVQENRTHHTDCSVNLECPQDWLSHRDKCFRVFQVSNTWEEGQADCGRKGATLLLIQDQ
ELRFLDSIKEKYNSFWIGLRFTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKITGVTENGSCATISGDKVTSESCSTD
NRWICQKELNHKTPSNDS

Obrázek 5.1: Aminokyselinová sekvence celého proteinu NKR-P1B.

Fialově je vyznačena cytoplazmatická doména, zeleně transmembránová, černě extracelulární, z toho exprimovaná část je podtržená a červeně je C-lektinová doména.

MCVTKASLPMLSPTGSPQEVEVGKILQGKRHGTISPESCAKLYCYYGVIMVLTVAVIALSVALSATKTEQIP
 VNKTYAACPQNWIGVENKCFYFSEYPSNWTFAQAFCAQEAQLARFDNQDELNFMRYKANFDSWI
GLHRESSEHPWKWTDNTEYNNTIPIRGEERFAYLNNNGISSTRIYSLRMWICKLNSYSLHCQTPFFPS

Obrázek 5.2: Aminokyselinová sekvence celého proteinu Clr-b.

Fialově je vyznačena cytoplazmatická doména, zeleně transmembránová, černě extracelulární, z toho exprimovaná část je podtržená a červeně je C-lektinová doména.

Další údaje týkající se exprimovaných částí proteinů jsou uvedeny v tabulce 5.1.

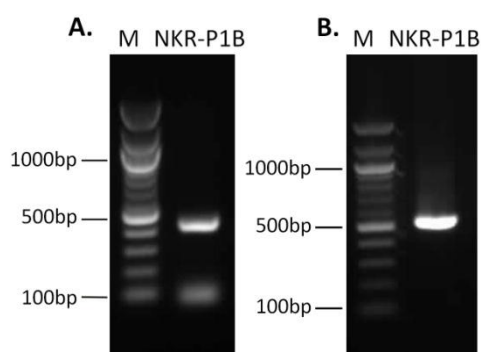
	Celá extracelulární část NKR-P1B	Ligand-vazebná část NKR-P1B	Clr-b
Mw	18 230,79 Da	15 462,35 Da	14 450,77 Da
pI	5,38	4,76	6,13

Tabulka 5.1: Teoretická monoizotopická molekulová hmotnost (Mw) a izoelektrický bod (pI) produkovaných částí proteinů NKR-P1B a Clr-b.

Vektory nesoucí sekvenci kódující ligand-vazebnou a celou extracelulární část proteinu NKR-P1B byly připraveny v rámci této diplomové práce. Konstrukt kódující Clr-b byl vyroben Mgr. Pavlem Hančem¹²⁵.

5.2 Příprava konstruktů kódujících NKR-P1B

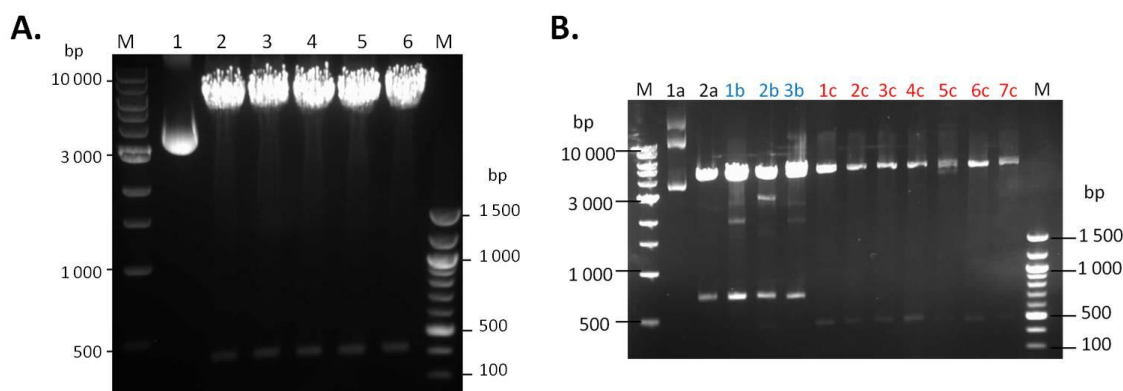
Nukleotidová sekvence kódující ligand-vazebnou a celou extracelulární část proteinu NKR-P1B byla získána pomocí PCR z celého genu, jak je popsáno v kapitole 4.1.1. Oligonukleotidy, které byly pro tuto reakci použity, jsou uvedeny v kapitole 3.7. Pro kontrolu délky vzniklého fragmentu byla provedena DNA elektroforéza na 1% agarózovém gelu podle postupu uvedeného v kapitole 4.8.1 (viz obrázek 5.3). Délka amplifikovaného fragmentu (zatím včetně přesahů za restrikčními místy pro endonukleázy *NdeI* a *HindIII*) odpovídala předpokladům, tedy 429 nukleotidům v případě ligand-vazebné části a 518 nukleotidům celé extracelulární části NKR-P1B. Přesahy byly po ethanolové precipitaci DNA (podle postupu v kapitole 4.1.2) odstraněny pomocí zmíněných endonukleáz a DNA byla podrobena restrikční analýze (kapitola 4.1.2).



Obrázek 5.3: Fragmenty odpovídající sekvenci A. ligand-vazebné a B. celé extracelulární části NKR-P1B připravené pomocí PCR.

Takto připravené inzerty s kohezními konci pak byly zaligovány do defosforylovaného expresního vektoru pET-30a(+). Plazmidy byly poté použity pro transformaci klonovacích buněk DH5 α (kapitola 4.1.2). Na LB agaru vyrostlo v obou případech 20 – 30 bakteriálních kolonií, na agaru, který sloužil jako negativní kontrola, žádné kolonie pozorovány nebyly, čímž byla vyloučena kontaminace.

Pro izolaci plazmidové DNA bylo vybráno šest bakteriálních kolonií nesoucích plazmid pET-30a(+) s inzertem kódujícím ligand-vazebnou část NKR-P1B a sedm s inzertem pro celou extracelulární část NKR-P1B. Z vybraných kolonií byly připraveny noční kultury, z nichž byla DNA izolována. Následně byla provedena restriční analýza (obrázek 5.4).



Obrázek 5.4: Restriční analýza pro ověření úspěšnosti ligace inzertů do expresního vektoru.

A. Ligand-vazebná část NKR-P1B: v dráze 1 je neštěpený plazmid pET-30a(+) nesoucí inzert NKR-P1B; ve zbylých drahách je tento konstrukt štěpený endonukleázami NdeI a HindIII.

B. Celá extracelulární část NKR-P1B:

- Písmenem „a“ jsou označeny dráhy s komerčně dodanou plazmidovou DNA. V dráze 1a je neštěpený plazmid pEGFN1 – NKR-P1B; v dráze 2a je plazmid štěpený endonukleázami BamHI a EcoRI. Tato restrikce sloužila jako pozitivní kontrola pro obě formy NKR-P1B.
- Písmenem „b“ jsou označeny dráhy, kam byla nanášena plazmidová DNA pEGFN1 – NKR-P1B izolovaná z klonovacích buněk DH5 α , štěpená endonukleázami BamHI a EcoRI.
- V dráhách označených písmenem „c“ je plazmid pET-30a(+) – NKR-P1B též izolovaný z buněk DH5 α , štěpený endonukleázami NdeI a HindIII.

Štěpené konstrukty svou velikostí odpovídají požadovaným fragmentům (viz tabulka 5.2), ligace tedy proběhla úspěšně.

Fragment	Velikost fragmentu
pEGFN1	~4,7 kbp
pET-30a(+)	~5,2 kbp
Celý gen NKR-P1B	730 bp
Ligand-vazebná část NKR-P1B	408 bp
Extracelulární část NKR-P1B	488 bp

Tabulka 5.2: Velikost fragmentů získaných restrikční analýzou.

Mezi testovanými nočními kulturami byla podle výsledků restrikční analýzy vybrána kultura, která je na obrázku 5.4 A v dráze číslo 4 a na obrázku 5.4 B v dráze 1c. Tyto kultury byly použity pro izolaci plazmidové DNA z většího objemu LB média (100 ml). Získaná DNA byla opět ověřena restrikční analýzou v 1% gelu.

Správnost sekvence inzertů NKR-P1B v expresním vektoru byla následně potvrzena také DNA sekvenováním.

5.3 Exprese rekombinantních proteinů NKR-P1B

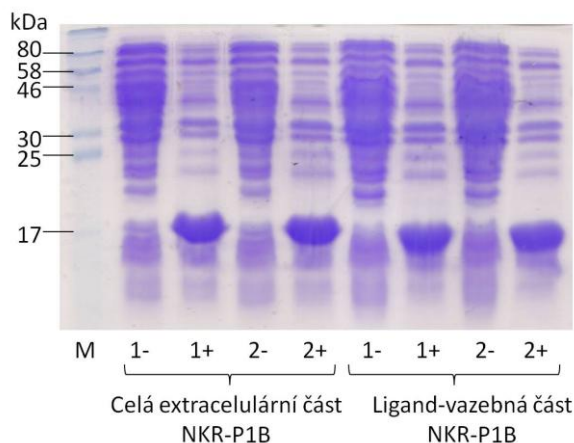
5.3.1 Transformace produkčních buněk a selekce produkčních klonů

Prvním krokem v expresi obou forem rekombinantního proteinu NKR-P1B byla transformace produkčních kompetentních buněk *E. coli* kmene *BL21-Gold* metodou tepelného šoku (kapitola 4.3.1).

Na obou Petriho miskách s LB agarem obsahujícím kanamycin vyrostlo více než 1 000 bakteriálních kolonií. Na agaru, který sloužil jako negativní kontrola, kolonie pozorovány nebyly, čímž byla vyloučena kontaminace.

Byly vybrány vždy dvě bakteriální kolonie za každou formu proteinu NKR-P1B, jež byly přeneseny do 2 ml LB média s antibiotiky a následně byly při teplotě 37 °C a 220 ot./min kultivovány přes noc. Tyto kultury byly dále použity pro selekci produkčního klonu, jak je popsáno v kapitole 4.3.2. Exprese rekombinantních proteinů v indukovaných buňkách byla analyzována elektroforeticky na 15% polyakrylamidovém gelu a porovnána s neindukovanými kulturami, jak je vidět na obrázku 5.5. V dráhách

označených na elektroforeogramu znaménkem plus jsou buňky, které byly indukovány 0,1mM IPTG a které produkují rekombinantní proteiny NKR-P1B o velikosti ~15,4 kDa a ~18,2 kDa.



Obrázek 5.5: Selekcce bakteriálního klonu pro produkci ligand-vazebné a celé extracelulární části NKR-P1B.

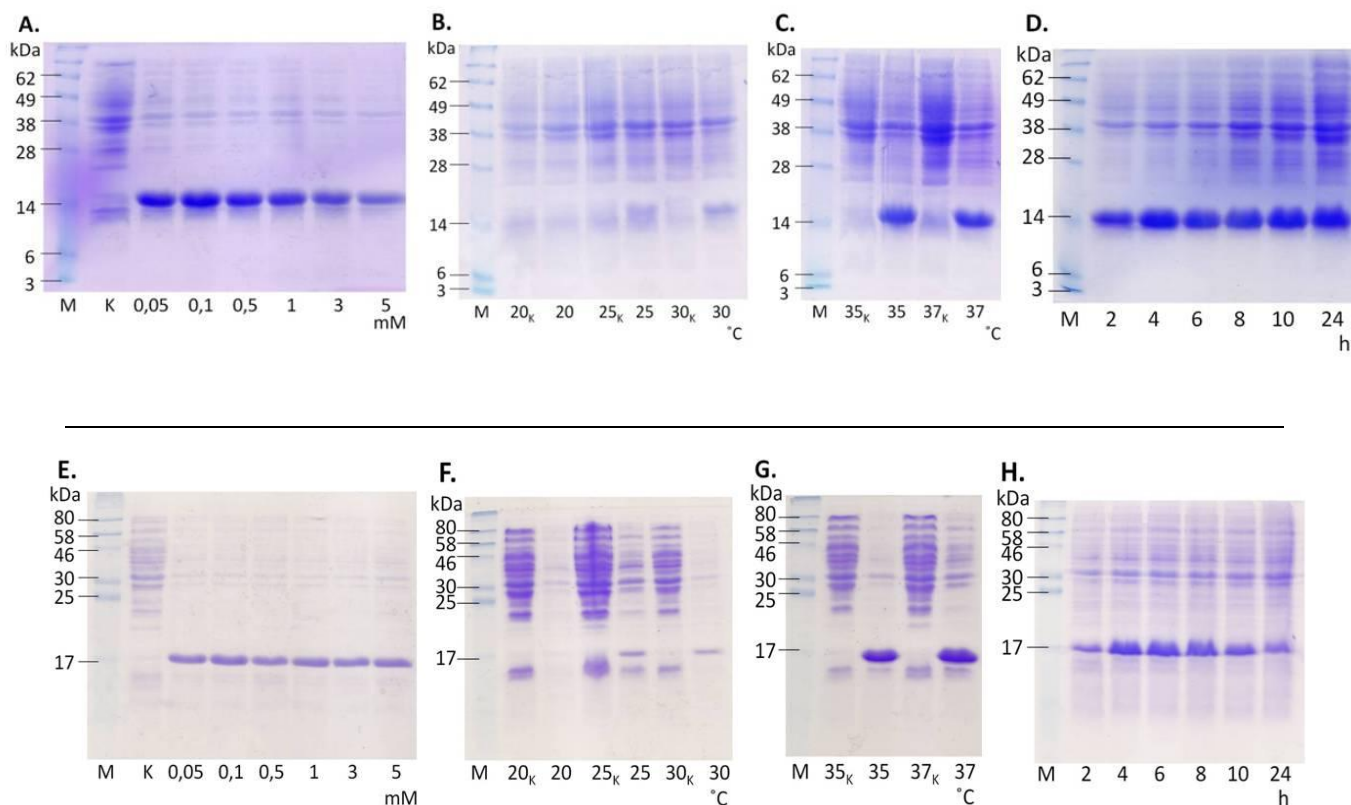
Do drah označených znaménkem plus byly naneseny indukované buňky produkující protein NKR-P1B, v dráhách označených znaménkem mínus jsou buňky neindukované.

Pro optimalizaci produkce proteinů ve velkém objemu média byly za oba proteiny vybrány klony číslo 2.

5.3.2 Optimalizace produkce proteinů NKR-P1B

Produkce proteinů byla optimalizována za účelem maximálních výtěžků v krátkém čase a s minimálními finančními náklady. Byla testována koncentrace induktoru, teplota a délka produkce (viz kapitola 4.3.3). Jednotlivé experimenty byly dvakrát až třikrát zopakovány z důvodu vyloučení náhodného výsledku.

Produkce byla vyhodnocována SDS elektroforézou na 15% polyakrylamidovém gelu (viz obrázek 5.6).



Obrázek 5.6: Analýza produkce proteinů NKR-P1B za různých podmínek.

Na obrázcích **A. – D.** je výsledek optimalizace produkce pro ligand-vazebnou část proteinu NKR-P1B, na obrázcích **E. – H.** pro jeho celou extracelulární část. **A. a E.** zobrazují optimalizaci koncentrace IPTG [mM]; **B., C. a F., G.** optimalizaci teploty [°C]; **D. a H.** optimalizaci délky produkce [h]. Písmeno „K“ značí neindukované buňky.

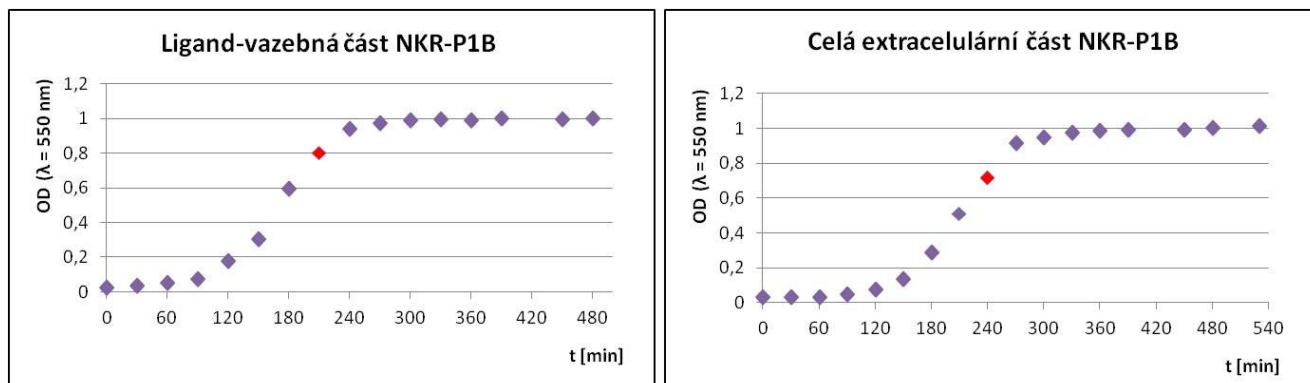
Proteiny NKR-P1B jsou buňkami dobře produkovány při téměř jakékoliv zvolené koncentraci induktoru. S ohledem na jeho co nejnižší množství byla jako nejvýhodnější zvolena podmínka 0,1 mM IPTG pro obě formy proteinu.

Při teplotách do 30 °C téměř nedocházelo k expresi požadovaných rekombinantních proteinů. V porovnání s 37 °C, při teplotě 35 °C bylo produkováno přibližně stejné množství proteinů NKR-P1B, ale množství ostatních bakteriálních proteinů, jež by ztěžovaly následnou purifikaci, byla nižší. Proto byla pro produkci ve velkém objemu média vybrána teplota 35 °C.

Z elektroforeogramů (hlavně z obrázku D) je patrné, že produkce trávající 4 hodiny je dostatečná. Množství rekombinantních proteinů se s narůstajícím časem nezvyšuje, ale opět roste exprese jiných bakteriálních proteinů.

Tyto vybrané podmínky pak byly použity pro produkci proteinů v 0,5 l LB média, kdy byla sledována růstová křivka produkčních bakterií (obrázek 5.7). Vždy po 30 minutách

byla spektrofotometricky měřena jejich optická denzita při vlnové délce 550 nm. Kultury byly indukovány při OD přibližně 0,8 ($\lambda = 550$ nm).



Obrázek 5.7: Růstové křivky bakterií produkujících proteiny NKR-P1B.

Červený bod značí indukci 0,1mM IPTG.

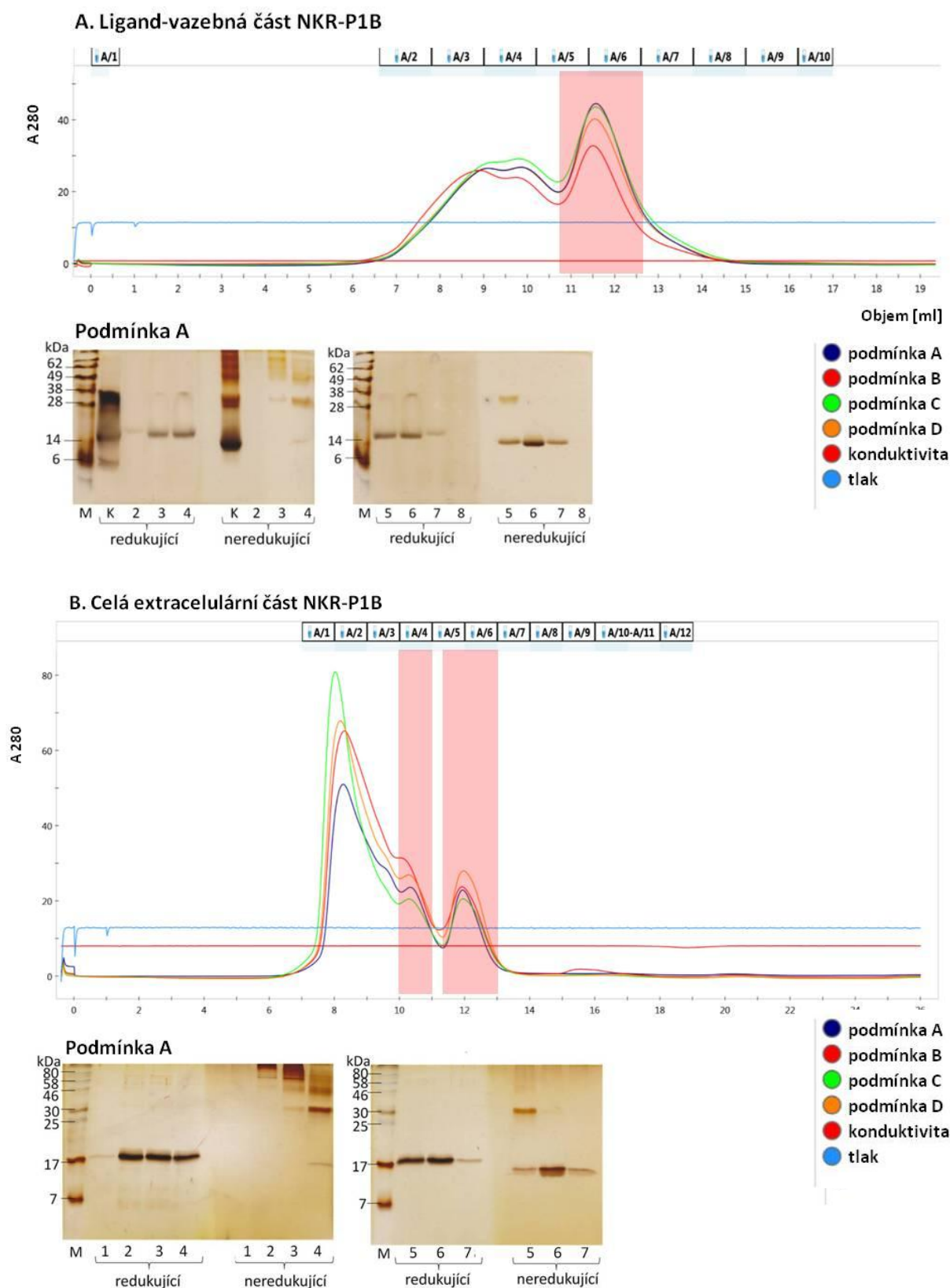
5.4 Renaturace rekombinantních proteinů

5.4.1 Optimalizace renaturace proteinů

Proteiny NKR-P1B byly renaturovány metodou rychlého naředění podle postupu v kapitole 4.4.1. Byly testovány čtyři různé renaturační podmínky lišící se pH, redoxním systémem a koncentrací proteinu, který byl přidáván do renaturačního pufru. Úspěšnost renaturace byla vyhodnocována metodou gelové filtrace.

Roztoky proteinů byly po renaturaci a dialýze zakoncentrovány pomocí ultrafiltrace a centrifugačních koncentrátorů (viz kapitola 4.5). Byla stanovena jejich koncentrace metodou podle Bradfordové (popsána v kapitole 4.7). Na kolonu Superdex 75 HR 10/300 bylo nanášeno vždy stejné množství proteinu, a to 200 μ g.

Výsledek optimalizace renaturace pro obě formy proteinů je na obrázku 5.8 a je doplněn analýzou jednotlivých frakcí pomocí SDS elektroforézy v redukujícím a neredukujícím prostředí (je uvedena pouze renaturační podmínka A pro obě formy proteinu NKR-P1B; výsledek ostatních renaturačních podmínek je téměř totožný a je součástí přílohy 1).



Obrázek 5.8: Eluční profily pro obě formy proteinu NKR-P1B sledovaných při $\lambda = 280$ nm metodou gelové filtrace na koloně Superdex 75 HR 10/300 (při průtoku 0,4 ml/min) za čtyř různých renaturačních podmínek a analýza jednotlivých frakcí v redukujícím a neredukujícím prostředí provedená pomocí SDS elektroforézy.

Růžovými pruhy jsou vyznačeny píky odpovídající proteinům NKR-P1B. Dráhy u elektroforeogramů jsou označeny čísly, které odpovídají analyzovaným frakcím u vybraných grafů; písmeno „K“ značí dráhu, kam byl nanesen vzorek, jenž byl následně použit pro purifikaci.

Ligand-vazebná část NKR-P1B

Z grafů získaných gelovou filtrací (obrázek 5.8 A) je patrné, že ligand-vazebná část proteinu NKR-P1B je produkována jako monomer (~15,4 kDa). Jemu odpovídá hlavní pík s vrcholem o retenčním objemu 11,5 ml a frakce 5, 6 a 7, které byly analyzovány SDS elektroforézou.

Široký pík s nižším retenčním objemem představuje různě agregovaný protein. Na elektroforeogramech v dráhách 4 a 5 je protein, který by svou velikostí odpovídal dimeru (~30,8 kDa).

Celá extracelulární část NKR-P1B

Dle grafů a SDS elektroforézy (obrázek 5.8 B) lze usoudit, že celá extracelulární část proteinu NKR-P1B se v roztoku vyskytuje ve formě monomeru (~18,2 kDa) a dimeru (~36,4 kDa).

Porovnáním se standardy, protein získaný při retenčním objemu 10,5 ml odpovídá svou velikostí dimeru NKR-P1B (na elektroforeogramu frakce 4 a 5 pro renaturační podmínku A), při objemu 12 ml jeho monomeru (frakce 6 a 7).

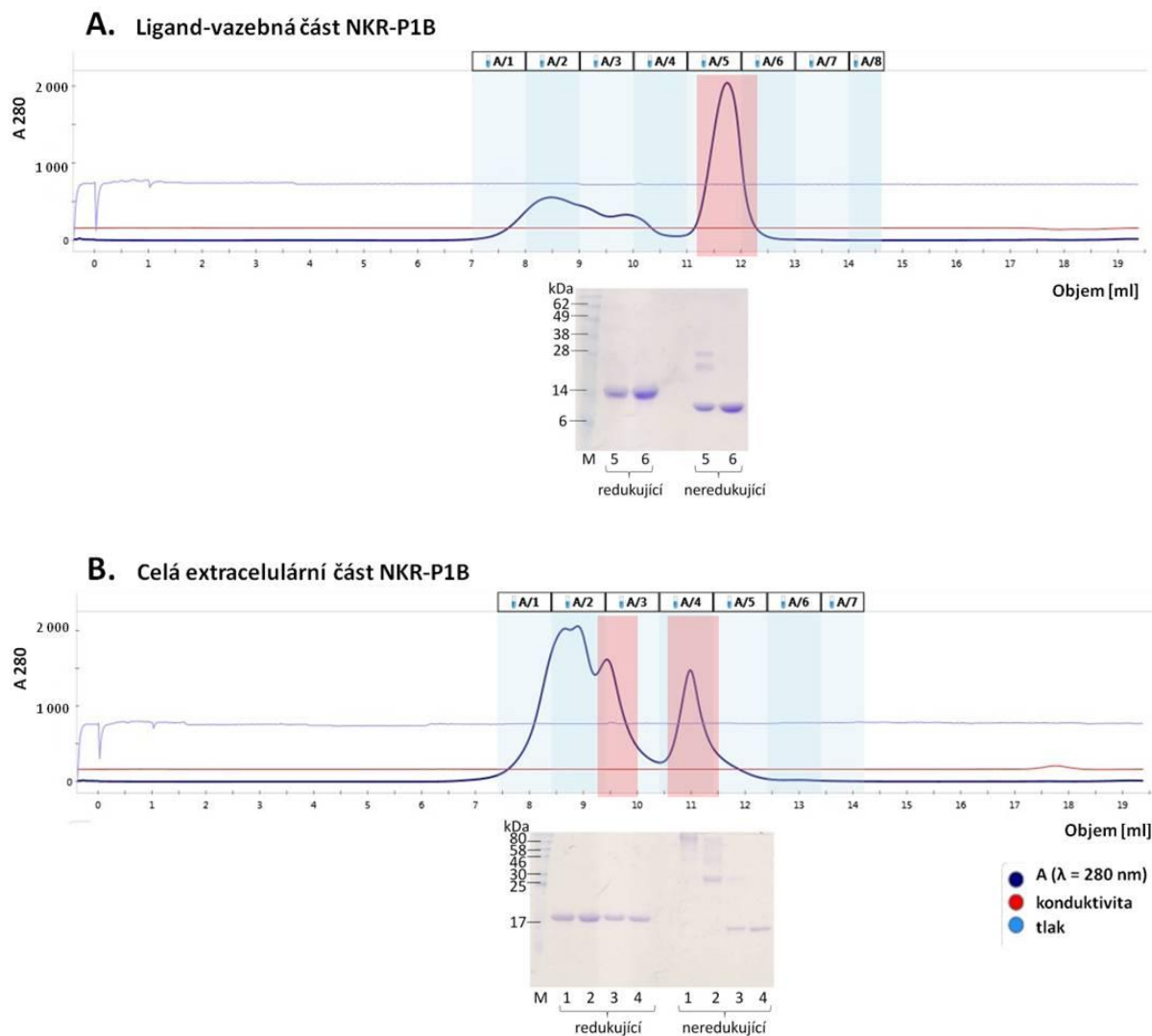
Ze srovnání grafů s ligand-vazebnou částí je vidět, že celá extracelulární část proteinu výrazně více agreguje (nejintenzivnější pík s vrcholem v 8 ml).

Ligand-vazebnou i celou extracelulární část proteinu NKR-P1B lze renaturovat za všech čtyř testovaných renaturačních podmínek, a to bez větších rozdílů. Nicméně pro obě formy proteinu byla shodně vybrána renaturační podmínka A, jelikož z grafů je patrné, že množství čistého proteinu je v poměru k jeho agregátům nejvyšší.

5.4.2 Velkoobjemová renaturace a purifikace proteinů

Purifikace proteinů NKR-P1B byla zopakována ve velkém objemu renaturačního pufru (800 ml) s vybranou podmínkou A.

Bylo zjištěno, že k purifikaci proteinů NKR-P1B je dostačující pouze metoda gelové filtrace. Proteiny byly separovány na koloně ENrich™ SEC 70 10 × 300 (obrázek 5.9).



Obrázek 5.9: Gelová filtrace proteinů NKR-P1B získaných z velkého objemu renaturačního pufru A. Růžovým pruhem je v grafu A. vyznačena ligand-vazebná část proteinu tvořící monomer; v grafu B. dimerní a monomerní forma celé extracelulární části proteinu. Separace probíhala na koloně ENrich™ SEC 70 10 × 300 při průtoku 0,4 ml/min.

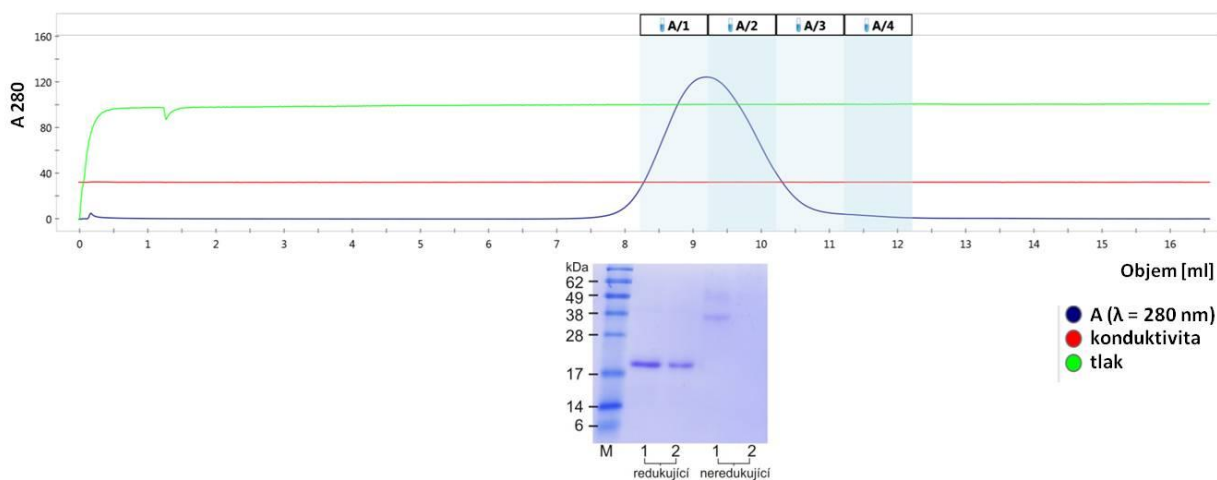
Ligand-vazebná část NKR-P1B

Ligand-vazebnou část proteinu lze získat v dostatečné čistotě již pomocí jedné gelové filtrace (viz elektroforeogram na obrázku 5.9 A).

Celá extracelulární část NKR-P1B

Pro purifikaci monomerní formy celé extracelulární části proteinu je na rozdíl od formy dimerní také dostatečná jedna gelová filtrace (viz dráhy 3 a 4 na elektroforeogramu 5.9 B).

Čistá dimerní forma proteinu byla získána několikrát zopakovanou gelovou filtrací na těžké koloně z frakce 3 podle obrázku 5.9 B (viz obrázek 5.10).



Obrázek 5.10: Dimerní forma celé extracelulární části proteinu NKR-P1B získaná šestikrokovou gelovou filtrací frakce 3 z obrázku 5.9 B.

Byla použita kolona ENrich™ SEC 70 10 × 300 a průtok 0,4 ml/min.

5.5 Stanovení koncentrace proteinů a celkového výtěžku

Koncentrace proteinů po finálních purifikacích byla stanovována metodou dle Bradfordové. Konečné výtěžky proteinů produkovaných v 0,5 l LB média jsou uvedeny v tabulce 5.3.

	Ligand-vazebná část	Celá extracelulární část	
	NKR-P1B	NKR-P1B	
	monomer	monomer	dimer
Výtěžek	13 mg	2 mg	2 mg

Tabulka 5.3: Celkové výtěžky proteinů NKR-P1B z 0,5 l LB média.

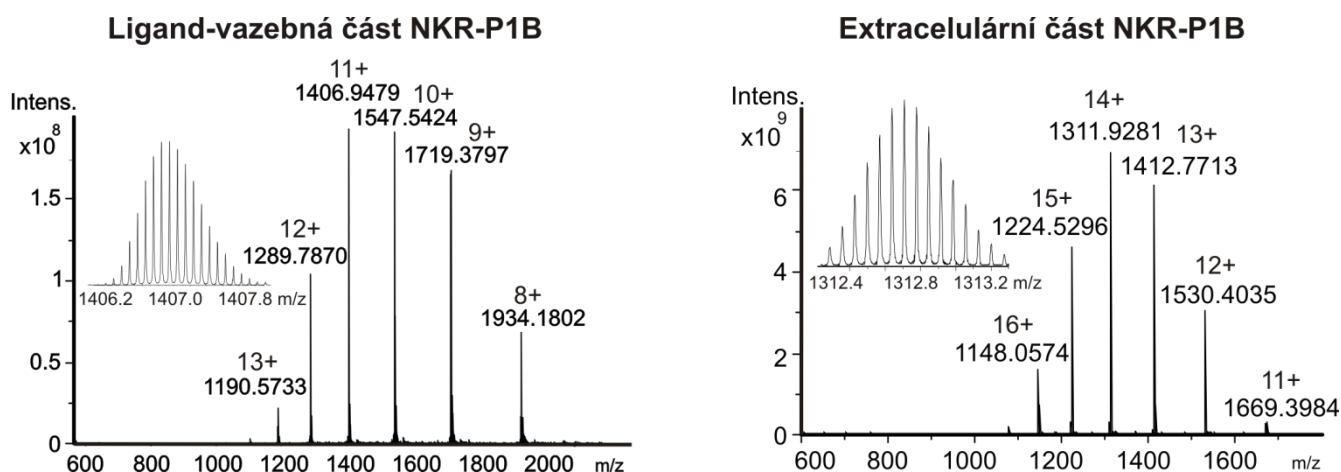
5.6 Ověření identity proteinů NKR-P1B

5.6.1 Přesná molekulová hmotnost proteinů

Po gelové filtraci byly frakce obsahující čisté neagregované proteiny NKR-P1B odsoleny (viz kapitola 4.9.1), aby mohla být pomocí hmotnostní spektrometrie ověřena homogenita a čistota vzorků, a také identita proteinů. Po dekonvoluci hmotnostního spektra byla stanovena jejich monoizotopická hmotnost v nativním stavu, tedy se zapojenými disulfidickými můstky. Naměřená hodnota hmoty proteinů byla porovnána s teoretickými hodnotami a byla vypočítána chyba měření, jak je uvedeno v tabulce 5.4. MS spektra proteinů s detaily vybraných nábojových stavů jsou na obrázku 5.11.

	Ligand-vazebná část NKR-P1B	Celá extracelulární část NKR-P1B
Teoretická M_w	15 457,3019 Da	18 353,7692 Da
Naměřená M_w	15 457,2946 Da	18 353,7785 Da
Chyba měření	0,4 ppm	0,5 ppm

Tabulka 5.4: Porovnání experimentálních molekulových hmotností s teoretickými hodnotami.
Monoizotopická molekulová hmotnost nativních proteinů NKR-P1B měřená ESI-FT-ICR MS.



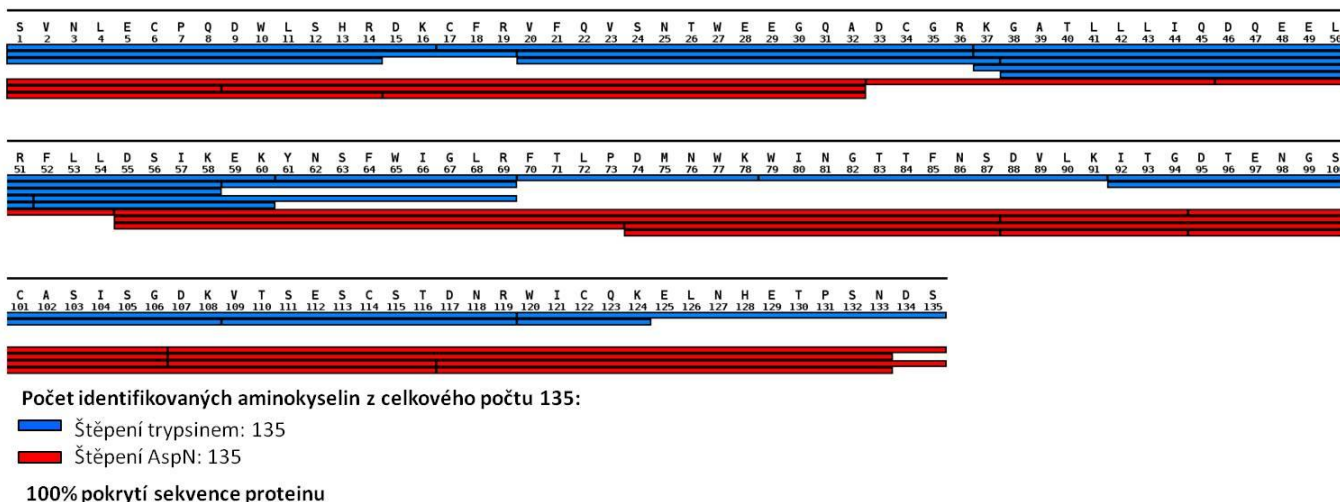
Obrázek 5.11: Hmotnostní spektra obou forem proteinu NKR-P1B měřená pomocí ESI-FT-ICR MS.

5.7 Struktura proteinů NKR-P1B

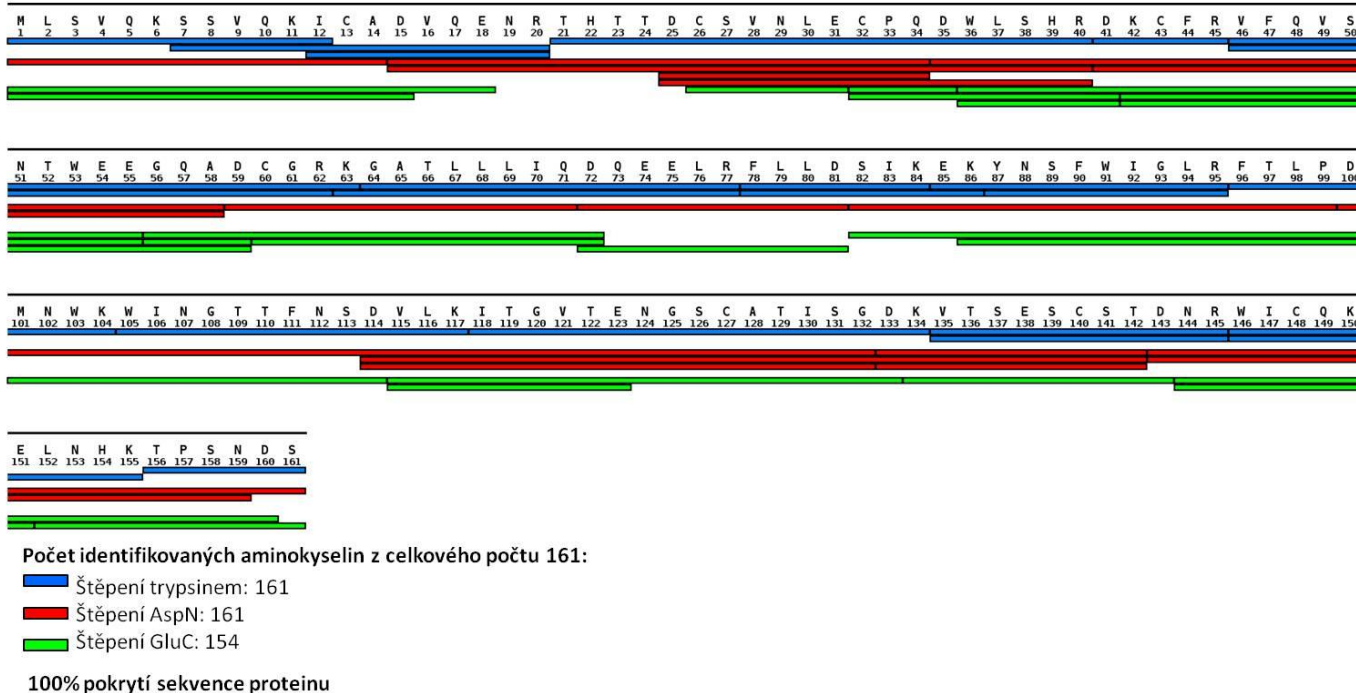
5.7.1 Identifikace disulfidických vazeb

Před analýzou disulfidických můstků bylo provedeno peptidové mapování metodou LC-MS (obrázek 5.12). Proteiny NKR-P1B byly štěpeny proteázami trypsinem, AspN a v případě celé extracelulární části proteinu také GluC.

A. Ligand-vazebná část NKR-P1B



B. Celá extracelulární část NKR-P1B



Obrázek 5.12: Sekvenční pokrytí ligand-vazebné a celé extracelulární části proteinu NKR-P1B. Proteiny byly štěpeny proteázami trypsinem, AspN a v případě celé extracelulární části proteinu také GluC. Peptidy byly analyzovány pomocí LC-MS.

S průměrnou chybou 0,5 ppm byly identifikovány peptidy pokrývající 100 % aminokyselinové sekvence obou proteinů NKR-P1B, mohlo být tedy překročeno k identifikaci disulfidických vazeb podle kapitoly 4.9.2.

V tabulkách 5.5 jsou uvedeny peptidy spojené disulfidickým můstkem, schematické znázornění vazeb je na obrázku 5.13.

A. Ligand-vazebná část NKR-P1B					
Proteáza	Peptidy spojené SS můstkem	Cysteiny spojené SS můstkem	Teoretická hmota peptidů	Experimentální hmota peptidů	Chyba [ppm]
trypsin	89*-102/103-107	C94 - C105	2 349,0867 Da	2 349,0874 Da	0,3
trypsin	108-125/208-223	C122 – C210	3 951,7664 Da	3 951,7639 Da	0,6
trypsin	179-196/197-207	C189 – C202	2 850,2004 Da	2 850,1970 Da	1,2
AspN	89*-97/98-120	C94 – C105	3 806,7444 Da	3 806,7432 Da	0,3
AspN	121-133/205-221	C122 – C210	3 468,7114 Da	3 468,7097 Da	0,5
AspN	176-194/195-204	C189 – C202	2 920,3037 Da	2 920,3027 Da	0,4

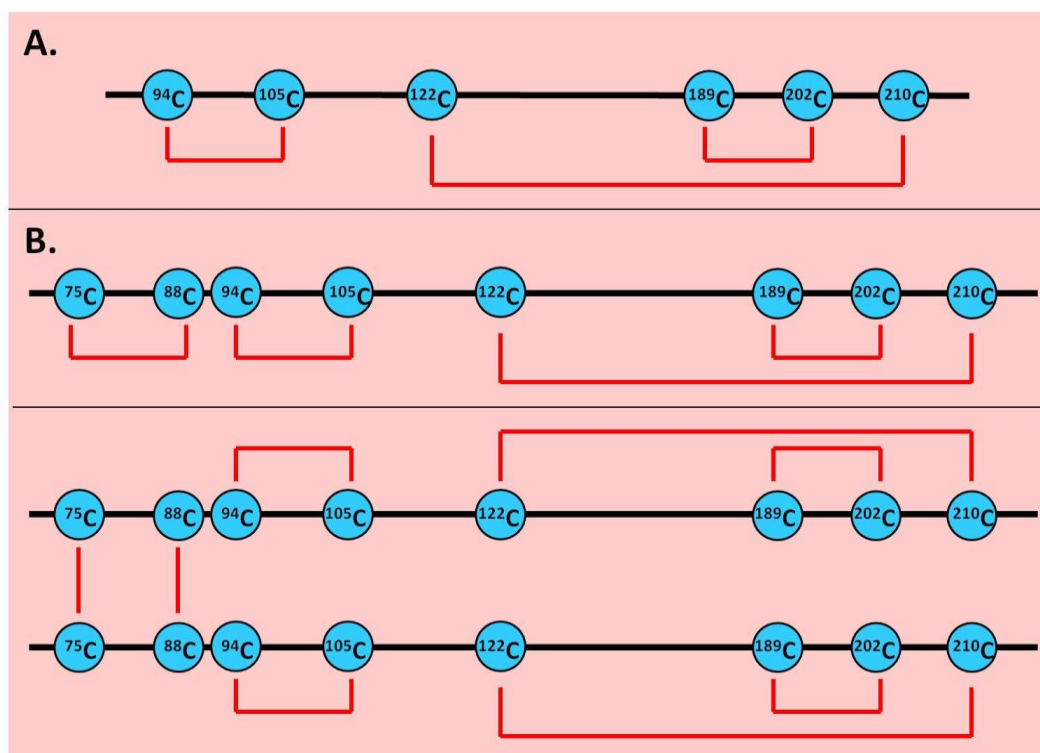
89* = serin, kterým začíná ligand-vazebná část proteinu NKR-P1B (N-konec)

B. Celá extracelulární část NKR-P1B: monomer					
Proteáza	Peptidy spojené SS můstkem	Cysteiny spojené SS můstkem	Teoretická hmota peptidů	Experimentální hmota peptidů	Chyba [ppm]
trypsin	108-124/208-212	C122 - C210	2 600,1660 Da	2 600,1651 Da	0,3
trypsin	180-196/197-207	C189 - C202	2 848,2576 Da	2 848,2599 Da	0,8
AspN	121-133/205-221	C122 - C210	3 468,7560 Da	3 468,7524 Da	1,0
AspN	176-194/195-204	C189 - C202	2 918,3531 Da	2 918,3522 Da	0,3
GluC	64*-77/81-93	C75 - C88	2 990,4390 Da	2 990,4381 Da	0,3
GluC	94-102/104-116	C94 - C105	2 781,2897 Da	2 781,2867 Da	1,1
GluC	186-195/201-205	C189 - C202	1 433,5082 Da	1 433,5085 Da	0,2

B. Celá extracelulární část NKR-P1B: dimer					
Proteáza	Peptidy spojené SS můstkem	Cysteiny spojené SS můstkem	Teoretická hmota peptidů	Experimentální hmota peptidů	Chyba [ppm]
trypsin	74-82/74-82	C75 - C75	2 091,9473 Da	2 091,9454 Da	0,9
trypsin	108-124/208-212	C122 - C210	2 600,1660 Da	2 600,1676 Da	0,6
trypsin	180-196/197-207	C189 - C202	2 848,2576 Da	2 848,2551 Da	0,9
AspN	64*-76/64*-76	C75 - C75	3 040,5952 Da	3 040,5964 Da	0,4
AspN	121-133/205-221	C122 - C210	3 468,7560 Da	3 468,7542 Da	0,3
AspN	176-194/195-204	C189 - C202	2 918,3531 Da	2 918,3567 Da	1,2
GluC	64*-77/64*-77	C75 - C75	3 270,6456 Da	3 270,6477 Da	0,6
GluC	81-93/81-93	C88 - C88	2 975,3096 Da	2 975,3126 Da	1,0
GluC	94-102/104-116	C94 - C105	2 781,2897 Da	2 781,2910 Da	0,4
GluC	186-195/201-205	C189 - C202	1 433,5082 Da	1 433,5069 Da	0,9

64* = leucin, kterým začíná celá extracelulární část proteinu NKR-P1B (N-konec)

Tabulky 5.5: Peptidy v ligand-vazebné a celé extracelulární části proteinu NKR-P1B spojené disulfidickým můstkem.



Obrázek 5.13: Zapojení disulfidických můstků v proteinu NKR-P1B.

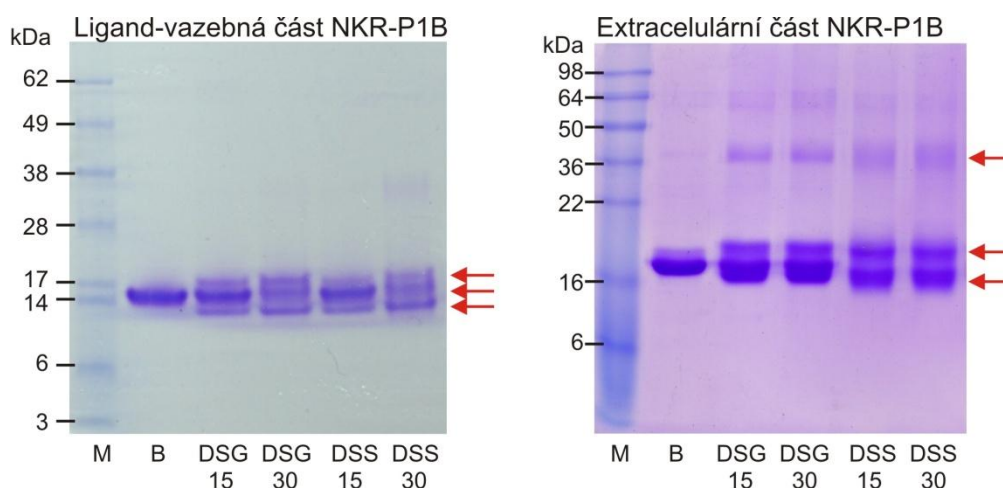
Obrázek A. znázorňuje ligand-vazebnou část NKR-P1B, obrázek B. monomerní a dimerní formu celé extracelulární části proteinu.

V ligand-vazebné části proteinu je spojen první cystein s druhým, třetí s šestým a čtvrtý s pátým. Cysteiny v oblasti krčku u celé extracelulární části NKR-P1B tvoří buď intermolekulární vazby v případě homodimeru, nebo je spojen první cystein s druhým v případě monomeru.

Způsob spojení cysteinů v proteinu NKR-P1B odpovídá ostatním NKR-P1 receptorům, jež byly v rámci naší laboratoře charakterizovány dříve^{121,126,127}, a stejně tak predikcím v databázi UniProt¹²⁸.

5.7.2 Chemické zesítnění proteinů NKR-P1B

K síťovacím reakcím byla použita činidla DSS a DSG, každé v 15molárním a 30molárním nadbytku oproti proteinu, jak je popsáno v kapitole 4.9.3. K síťovacím reakcím byla použita monomerní forma celé extracelulární části NKR-P1B. Na obrázku 5.14 jsou elektroforeogramy zesítněných proteinů.



Obrázek 5.14: SDS elektroforéza zesítněných proteinů NKR-P1B.

Červené šipky označují místa, která byla z gelu izolována a použita k LC-MS analýze. Písmenem „B“ je označen protein NKR-P1B, k němuž nebyla přidána žádná síťovací činidla.

Podle elektroforeogramu A vytvořila ligand-vazebná část NKR-P1B pouze monomery (~15,4 kDa). Bylo identifikováno celkem pět unikátních spojení mezi lysiny v proteinu.

Na elektroforeogramu B odpovídají místa izolovaná z gelu svou velikostí monomeru (~18,2 kDa) a dimeru (~36,4 kDa) celé extracelulární části proteinu NKR-P1B. Zde bylo detekováno šest unikátních vazeb.

V tabulkách 5.6 jsou uvedeny zesítněné peptidy.

A. Ligand-vazebná část NKR-P1B					
Činidlo	Zesítěné peptidy	Zesítěné aminokyseliny	Teoretická hmota peptidů	Experimentální hmota peptidů	Chyba [ppm]
DSG	89-102/140-148	S* - K146	2 928,4548 Da	2 928,4561 Da	0,4
DSS	89-102/140-148	S* - K146	2 970,5017 Da	2 970,5027 Da	0,3
DSG	89-102/208-223	S* - K212	3 793,7039 Da	3 793,6937 Da	0,2
DSG	103-107/140-148	K104 - K146	1 912,9842 Da	1 912,9856 Da	0,7
DSG	125-139/208-223	K125 - K212	3 721,8179 Da	3 721,8141 Da	1,0
DSS	140-157	K146 - K148	2 367,2679 Da	2 325,2716 Da	1,5
DSS	147-157/208-223	K148 - K212	3 449,6271 Da	3 449,6238 Da	0,9

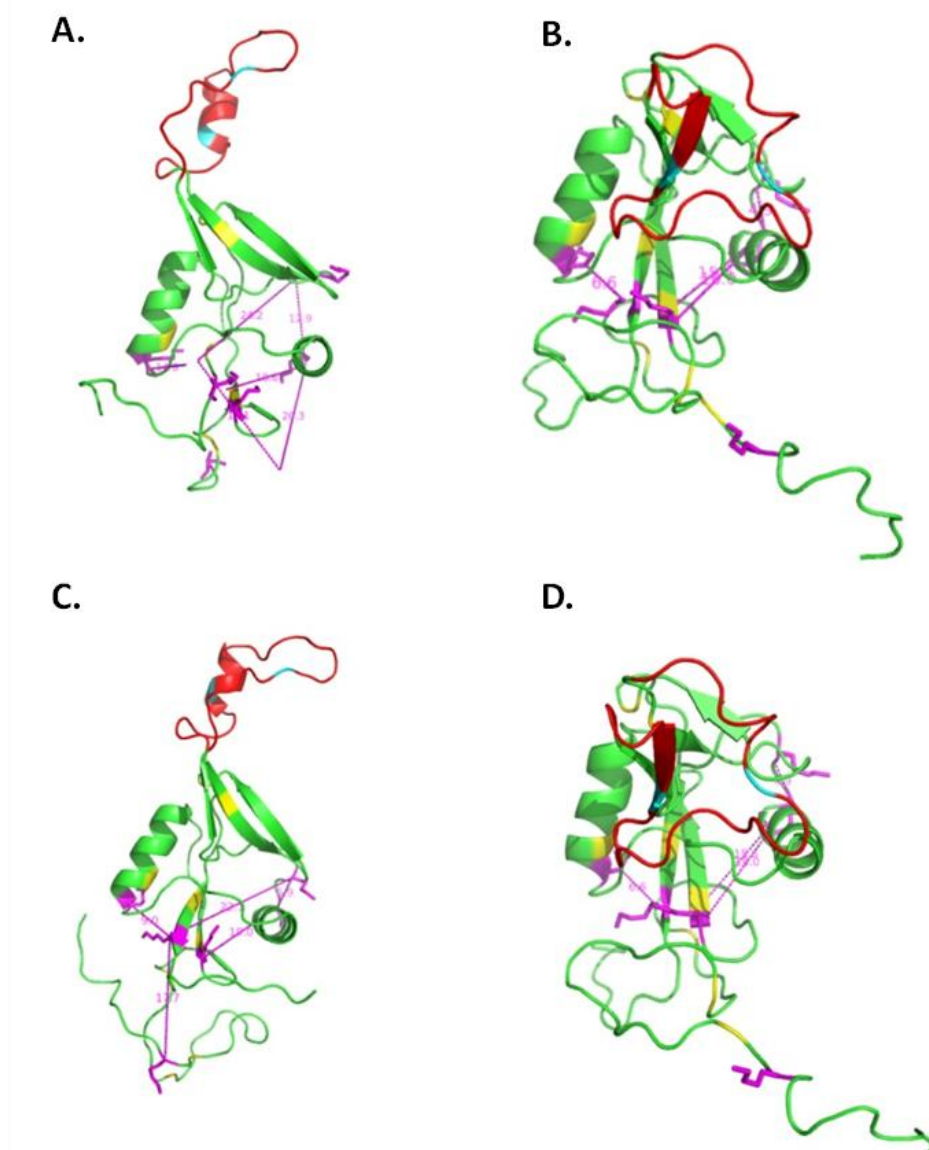
S* = serin na N-konci proteinu

B. Celá extracelulární část NKR-P1B					
Činidlo	Zesítěné peptidy	Zesítěné aminokyseliny	Teoretická hmota peptidů	Experimentální hmota peptidů	Chyba [ppm]
DSG	68-82/140-148	K73-K146	2 761,4034 Da	2 761,4058 Da	0,8
DSS	68-82/140-148	K73-K146	2 803,4504 Da	2 803,4527 Da	0,8
DSS	146-157/208-223	K148-K212	3 449,6271 Da	3 449,6292 Da	0,6
DSG	146-157/208-223	K148-K212	3 407,5801 Da	3 407,5784 Da	0,4
DSS	68-82/208-223	K73-K212	3 610,6621 Da	3 610,6613 Da	0,2
DSG	103-107/140-148	K104-K146	1 912,9842 Da	1 912,9869 Da	1,4
DSG	125-139/208-223	K125-K212	3 721,8179 Da	3 721,8162 Da	0,4
DSS	140-157	K146-K148	2 325,2701 Da	2 325,2701 Da	0,9

Tabulky 5.6: Zesítěné peptidy v ligand-vazebné a celé extracelulární části proteinu NKR-P1B.

5.7.3 Modely proteinů

Data získaná chemickým zesítním proteinů a identifikací disulfidických vazeb byla využita k vytvoření modelu NKR-P1B (obrázek 5.15). Jako templát sloužil model proteinu NKR-P1A z myšího kmene C57BL/6 vytvořený pomocí rentgenostrukturní analýzy nebo MS technik (viz kapitola 4.9.4).



Obrázek 5.15: Modely proteinů NKR-P1B vytvořené dle modelu NKR-P1A a dat z chemického zesítnění proteinů a zapojení disulfidických můstků.

A. Model ligand-vazebné části proteinu vytvořený podle rentgenostrukturní analýzy; **B.** s využitím MS technik; **C.** Model celé extracelulární části proteinu podle rentgenostrukturní analýzy a **D.** MS technik.

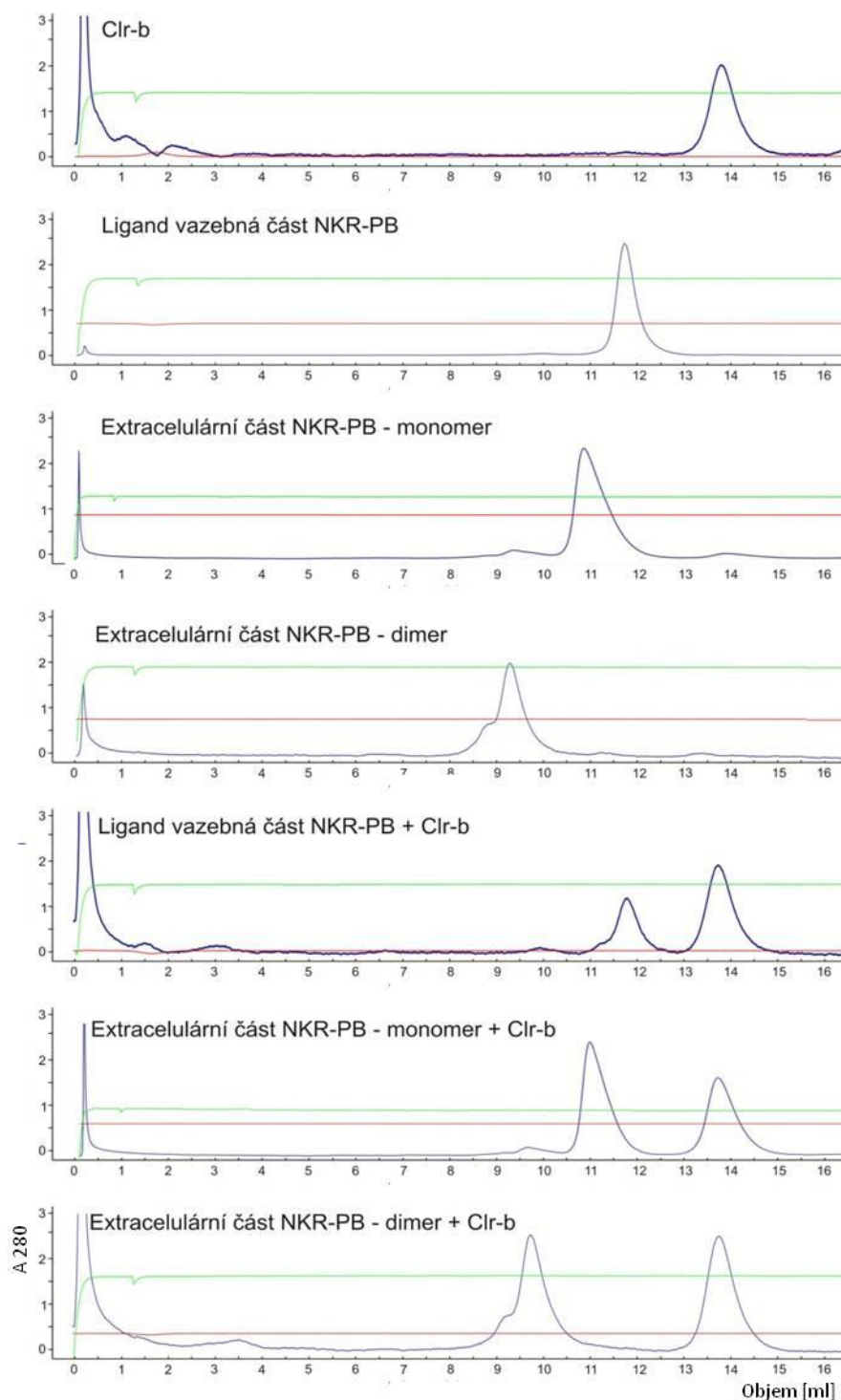
Červeně je vyznačena smyčka, jejíž pozice se mezi modely A a B / C a D liší; růžově jsou znázorněny lysiny, které jsou spojené homobifunkčními činidly; světle modrou lysiny ve smyčce, které se nespárovaly; žlutě cysteiny.

5.8 Interakce NKR-P1B a Clr-b testovaná biofyzikálními metodami

5.8.1 Gelová filtrace

Interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b byla testována ve fosfátovém pufru za tří různých hodnot pH (7,5; 7,0; 6,5). Na kolonu byl vždy nejprve nanesen každý protein zvlášť, který byl předtím převeden do daného pufru, a sloužil jako standard. Následně byl NKR-P1B (ligand-vazebná část proteinu, monomerní nebo dimerní forma celé jeho extracelulární části) smíchán s Clr-b, 5 minut inkubován při laboratorní teplotě a analyzován gelovou filtrací. Koncentrace obou proteinů pro sledování interakce byla 1 μ M. Příklad výsledku interakce ve fosfátovém pufru o pH 7,5 je uveden na obrázku 5.16.

Metodou gelové filtrace interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b zjištěna nebyla, a to v žádném z testovaných prostředí.



Obrázek 5.16: Interakce testovaná metodou gelové filtrace ve fosfátovém pufru o pH 7,5 na koloně ENrich™ SEC 70 10 × 300 a při průtoku 0,4 ml/min.

Jako standard byly použity samostatné proteiny Clr-b, ligand-vazebná část NKR-P1B, monomerní a dimerní forma celé extracelulární části NKR-P1B.

5.8.2 Povrchová plazmonová rezonance

Interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b byla testována také metodou povrchové plazmonové rezonance za týchž podmínek použitých pro gelovou filtraci. Ani touto metodou, i přes její vyšší citlivost, žádná specifická vazba proteinů prokázána nebyla.

5.9 Interakce NKR-P1B a Clr-b testovaná biologickými metodami

5.9.1 Tkáňové řezy

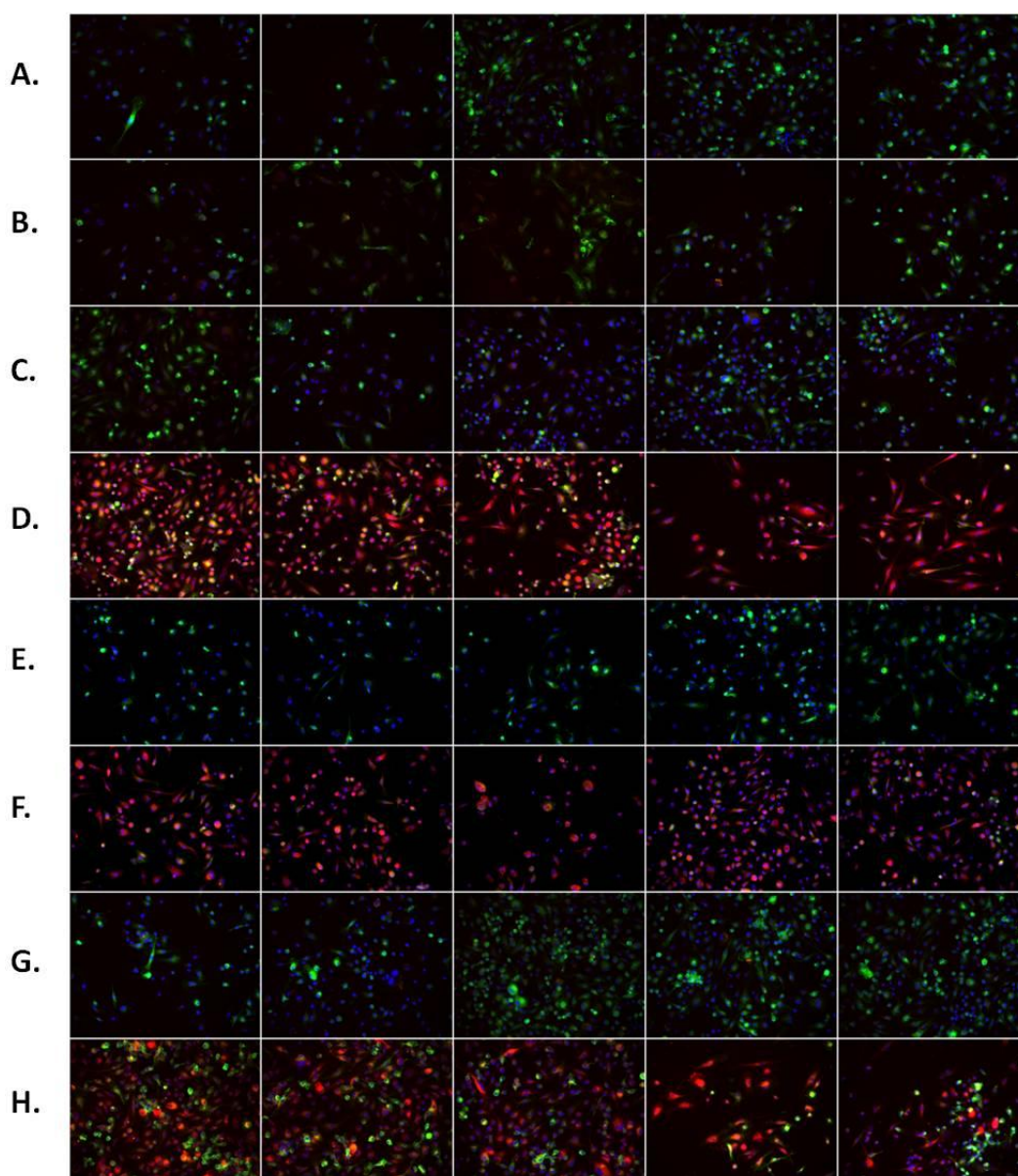
V případě značení tkáňových řezů proteiny NKR-P1B s fluorescenční sondou není možné interakci vyhodnotit z důvodu vysoké autofluorescence negativní kontroly. Snímky kryorezů jsou součástí přílohy 2.

5.9.2 Buňky kostní dřeně

Buňky kostní dřeně byly značeny ligand-vazebnou částí proteinu NKR-P1B a dimerní i monomerní formou celé jeho extracelulární části, a to ve dvou různých koncentracích (0,1 a 1 $\mu\text{g/ml}$). Každý preparát byl vyfocen pětkrát a tyto snímky byly seřazeny vedle sebe do řádku (viz obrázek 5.17). Značení buněk bylo provedeno podle postupu popsaného v kapitole 4.11.3.

Zelená barva na snímcích představuje buňky exprimující MHC glykoproteiny II. třídy fúzované s GFP, modrá jádra buněk označená DAPI a červená fluorescenčně značené proteiny NKR-P1B (v případě pozitivní kontroly buňky, na něž se navázal *peanut* lektin).

Z obrázku 5.17 vyplývá, že na buňky kostní dřeně (na jejichž povrchu by měl být dle literatury exprimován protein Clr-b) se váže pouze monomerní forma proteinu NKR-P1B, a to jak jeho ligand-vazebná, tak celá extracelulární část, o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ (řádky označené písmeny D a F).



Obrázek 5.17: Buňky kostní dřeně získané z myšního femuru značené proteiny NKR-P1B s fluorescenční sondou.

A. Dimerní forma celé extracelulární části proteinu, koncentrace 0,1 µg/ml; **B.** Monomerní forma celé extracelulární části proteinu, koncentrace 0,1 µg/ml; **C.** Dimerní forma celé extracelulární části proteinu, koncentrace 1 µg/ml; **D.** Monomerní forma celé extracelulární části proteinu, koncentrace 1 µg/ml; **E.** Ligand-vazebná část proteinu, koncentrace 0,1 µg/ml; **F.** Ligand-vazebná část proteinu, koncentrace 1 µg/ml; **G.** Negativní kontrola; **H.** Pozitivní kontrola (peanut lektin).

6 DISKUZE

Interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b byla poprvé popsána roku 2004 a byla testována na buněčné úrovni. Podstatou experimentu byla transfekce buněčné linie BWZ chimerní cDNA kódující extracelulární doménu NKR-P1B fúzovanou s modifikovanou stimulační cytoplazmatickou CD3 ζ podjednotkou. Konstruktem nesoucím Clr-b byly transfekovány buňky 293T. Jestliže došlo k interakci proteinů NKR-P1B a Clr-b, BWZ buňky byly stimulovány k produkci β -galaktozidázy, jejíž aktivita byla následně v médiu stanovována kolorimetricky¹.

Dosud však není znám molekulární mechanismus interakce mezi těmito proteiny, chybí její biochemický důkaz. Není také známa kinetika interakce nebo její vazebné konstanty. Nebyla ani popsána struktura žádného z vazebných partnerů.

Studium interakce receptoru NKR-P1B s jeho ligandem by mohlo přispět k objasnění principu fungování NK buněk a částečně k tomu, za jakých okolností k vazbě dochází (například vliv pH nebo iontové síly na vazbu). Zbývá také lépe popsat regulaci exprese proteinu Clr-b a relativní roli NKR-P1B v rámci receptorového repertoáru NK buněk. Interakce těchto proteinů totiž představuje obranný systém organismu, který funguje nezávisle na expresi MHC molekul. Reaguje na různé formy buněčného stresu, účastní se protivirové či protinádorové imunity (zajímavým příkladem je schopnost NK buněk odpovídat prostřednictvím tohoto systému na chemoterapeutika, což jim umožňuje podílet se na eliminaci transformovaných buněk¹¹⁸). Prostředí *in vivo* je ale velice komplexní, aktivita NK buněk je výrazně ovlivňována složením receptorového repertoáru, který může určovat „výšku“ aktivačního prahu buňky, nebo mikroprostředím, kdy chemokiny a cytokiny řídí lokalizaci a funkci NK buněk (regulační vs. cytotoxické imunofenotypy).

Jedinými proteiny z C-lektinových rodin NKR-P1 a Clr, u nichž byla vyřešena struktura, je NKR-P1A¹⁰⁹, NKR-P1C¹¹⁰ a Clr-g¹¹⁶ z myšího kmene B6. Zatím nejsou popsány ani všechny ligandy NKR-P1 receptorů (viz tabulka 1.3).

Cílem této práce je proto připravit renaturovaný protein NKR-P1B a pomocí chemického zesíťení v kombinaci s MS získat jeho základní strukturní charakterizaci, která bude důležitým doplňkem při řešení struktury pomocí metod s vysokým rozlišením, jako je rentgenostrukturní analýza nebo NMR spektroskopie. Úplné vyřešení

struktury obou proteinů, případně jejich komplexu, by mohlo být základem pro vyřešení interakce a byl by podán přímý důkaz její existence.

V rámci diplomové práce byly s využitím specifických oligonukleotidů metodou PCR amplifikovány sekvence kódující ligand-vazebnou a celou extracelulární část proteinu NKR-P1B. Jako templát sloužil komerčně připravený celý gen NKR-P1B. Získané fragmenty byly zaligovány do expresního vektoru pET30-a(+).

Tyto dvě formy proteinu se liší přítomností krčku, který odděluje C-lektinovou doménu od cytoplazmatické membrány buňky. Produkci obou forem proteinu a následným porovnáním jejich biochemických a strukturních vlastností by mohl být zjištěn vliv krčku na konformaci receptoru, a tím pádem i na interakci s jeho ligandem. Ve studii z roku 2009 byly zjištěny dvě různé konformace receptoru Ly49 způsobující *cis* a *trans* vazebnou aktivitu v závislosti na přítomnosti krčku¹²⁹.

Pro nízkou finanční a časovou náročnost byl pro expresi NKR-P1B a Clr-b vybrán bakteriální expresní systém, který umožňuje snadnou produkci rekombinantních proteinů v poměrně velkém množství. Nevýhodou však je nepřítomnost posttranslačních modifikací, především glykosylace, která by mohla mít vliv na správnou konformaci proteinu nebo na interakci s jeho vazebným partnerem. Překážku mohou představovat také inkluzní tělíska, v nichž je rekombinantní protein produkován. Jeho izolace vyžaduje denaturaci a následně nalezení vhodných renaturačních podmínek, které umožní poskládání proteinu do nativní rozpustné konformace.

Pomocí elektroforetické analýzy byly nejdříve nalezeny optimální podmínky pro produkci proteinů. Byla testována koncentrace induktoru, teplota a délka produkce. Dalším krokem byla optimalizace renaturace proteinů, kdy bylo pomocí gelové filtrace zjištěno, že proteiny jsou bez větších rozdílů renaturovány za všech čtyř testovaných podmínek. Ligand-vazebná část proteinu se renaturuje jako monomer a pro její purifikaci je dostačující pouze jedna separace gelovou filtrací, zatímco celá extracelulární část proteinu se vyskytuje v monomerní a dimerní formě. Monomer lze získat v dostatečné čistotě také jedнокrokovou separací, pro purifikaci dimeru je nutné metodu několikrát opakovat. V případě celé extracelulární části NKR-P1B dochází během procesu renaturace ke značným ztrátám proteinu z důvodu jeho agregace, která je nejspíše zapříčiněna přítomností krčku. Tento jev byl již v naší laboratoři pozorován při přípravě dimerní formy receptoru CD69.

Celkové výtěžky ligand-vazebné části rekombinantního proteinu z 0,5 l média se pohybují okolo 13 mg, extracelulární části okolo 4 mg. V tomto množství je možné proteiny získat za 4 až 5 dní od transformace produkčních kompetentních buněk.

Identita rekombinantních proteinů a čistota proteinových vzorků byla ověřena hmotnostní spektrometrií metodou ESI-FT-ICR MS. Experimentální molekulová hmotnost proteinů odpovídala teoretickým hodnotám po odečtení hmoty šesti vodíků v případě ligand-vazebné části proteinu a osmi u celé extracelulární části. Byla tak prokázána přítomnost disulfidických vazeb, tři u ligand-vazebné a čtyř u celé extracelulární části proteinu. Jejich pozice byly následně identifikovány pomocí štěpení specifickými proteázami (trypsinem, AspN, GluC) a LC-MS analýzy. Způsob zapojení cysteinů v proteinu NKR-P1B odpovídá C-lektinové doméně obecně¹³⁰, dříve charakterizovaným proteinům NKR-P1A¹²⁶, NKR-P1C¹²⁷ nebo NKR-P1D¹²¹ v naší laboratoři a shoduje se i s predikcemi v databázi UniProt¹²⁸.

Abychom získali představu o vzdálenostech jednotlivých aminokyselin v proteinu (konkrétně aminoskupin na postranním řetězci lysinů nebo na N-konci proteinu), byly provedeny síťovací reakce v kombinaci s MS. Byla použita homobifunkční činidla DSG a DSS (s délkou ramének 7,7 Å a 11,4 Å) v 15molárním a 30molárním nadbytku oproti proteinům NKR-P1B. V sekvenci ligand-vazebné části proteinu se nachází osm lysinů a bylo nalezeno celkem pět unikátních spojení. Celá extracelulární část má o dva lysiny víc a unikátních vazeb bylo identifikováno šest.

Data získaná identifikací disulfidických můstků a chemickým zesítním byla využita k vytvoření počítačových modelů proteinů NKR-P1B. Jako templát sloužila struktura NKR-P1A (B6), která byla vyřešena pomocí rentgenostrukturní analýzy¹⁰⁸ a MS technik¹⁰⁹. Aminokyselinové sekvence proteinů NKR-P1A a B jsou shodné z ~80 %, což usnadňuje řešení struktury obou našich proteinů.

Struktura NKR-P1A získaná těmito dvěma technikami se liší polohou smyčky (na obrázku 5.15 je vyznačena červeně na proteinu NKR-P1B), která se nachází ve struktuře proteinu získané rentgenostrukturní analýzou v extendované poloze od zbytku molekuly, zatímco ve struktuře získané pomocí metod MS je k ní stočena. Rozdíl v poloze smyčky může být vysvětlen odlišným přístupem obou metod. Příprava krystalu pro rentgenostrukturní analýzu vyžaduje vysoké koncentrace proteinu (>10 mg/ml), solí a jiných látek napomáhajících krystalizaci. Protein je tedy vystaven nefyziologickým podmínkám, což může ovlivnit jeho výslednou konformaci. Tato

smyčka tedy může představovat artefakt vzniklý krystalizací, ale právě v krystalu sloužila k interakci s další molekulou NKR-P1A. Může jít také o změnu konformace proteinu v závislosti na vazbě ligandu¹⁰⁹. K vyřešení konformace smyčky za fyziologických podmínek byla v případě NKR-P1A použita metoda chemického zesíťení a také H/D výměna. Publikovaná data ukazují na pozici smyčky interagující se zbytkem molekuly. Stejný jev byl pozorován i v případě receptoru NKR-P1C. Nicméně v obou případech se jedná o aktivační receptory a situace u NKR-P1B může být odlišná.

V sekvenci proteinu NKR-P1B jsou v oblasti chlopně dva lysiny (Lys¹⁰⁴ a Lys¹¹⁷, na obrázku 5.15 vyznačeny světle modrou barvou), avšak u žádného z nich nedošlo k chemickému zesíťení. Z této skutečnosti vyplývá, že pokud by byla smyčka sklopena k molekule proteinu, pravděpodobně by došlo ke spojení s některým z dalších lysinů. Tudíž se dá předpokládat, že u inhibičního receptoru NKR-P1B by mohla být smyčka s největší pravděpodobností extendovaná.

Aby byla poloha smyčky vyřešena, bylo by možné použít chemická činidla s delším raménkem, například BS(PEG), kde se délka raménka pohybuje okolo 28 Å (tato vzdálenost by stačila ke spojení lysinu ve smyčce proteinu s lysinem v jádru proteinu).

Protein NKR-P1B vzhledem k literatuře strukturně zapadá mezi C-lektiny. Skládá se ze dvou α -helixů, dvou β -listů a smyčky^{98,99}, výše zmíněné pozice smyčky byly ale prozatím zjištěny pouze u proteinu NKR-P1A¹⁰⁹.

Interakce proteinů NKR-P1B s ligandem Clr-b byla nejdříve otestována metodou gelové filtrace. Byl vybrán fosfátový pufr, jehož složení je podobné prostředí v organismu, a fyziologické pH, protože receptor NKR-P1B je inhibiční. Jeho úlohou je tedy brzdit cytotoxickou aktivitu NK buněk za nepatologických podmínek a zabraňovat jim tak v poškozování vlastních zdravých tkání. Jelikož ale dochází během zánětu k poklesu pH, byly zvoleny i nižší hodnoty (7,0 a 6,5). Navíc byla za sníženého pH zjištěna slabá interakce homologu NKR-P1B (proteinu NKR-P1D) s jeho vazebným partnerem Clr-b¹²¹. Ani přes to, že byly testovány různé podmínky pro interakci a všechny formy proteinů NKR-P1B (viz obrázek 5.16), vazba zjištěna nebyla.

Bylo tedy přikročeno k citlivější metodě, a to k povrchové plazmonové rezonanci, která je schopna rozlišit vazebné interakce v řádu nM. Vazba proteinů byla ověřována opět ve fosfátovém pufru a za tří hodnot pH (7,5; 7,0; 6,5). Kromě toho, že na povrch senzoru byly postupně imobilizovány všechny testované proteiny, kdyby došlo u některého z nich ke skrytí vazebného místa, byl testován také vliv vápenatých iontů

na interakci. Některé C-lektiny totiž vytváří s těmito ionty komplex a teprve poté jsou schopny vazby⁹⁸. Výsledek byl však totožný s výsledky získanými gelovou filtrací, interakce proteinů NKR-P1B a Clr-b potvrzena nebyla.

Pravděpodobnost interakce proteinů by mohla být zvýšena, jestliže se podmínky ještě více přiblíží prostředí v organismu (alespoň jeden z vazebných partnerů bude na povrchu savčí buňky). A vzhledem k tomu, že k expresi Clr-b dochází v širokém spektru buněk a tkání, byly z myši izolovány buňky kostní dřeně, slezina, thymus a uzlina, a byly značeny rekombinantními proteiny NKR-P1B s navázanou fluorescenční sondou.

Vyhodnocení vazby NKR-P1B na tkáňové řezy bylo znemožněno vysokou autofluorescencí negativní kontroly. Na každém snímku mohou být navíc desítky buněčných typů a u některých z nich je exprese Clr-b vysoká (například u maturovaných splenocytů¹), což by ke stanovení specifické vazby nemuselo přispět.

Na diferencovaných buňkách z kostní dřeně myši již vazba fluorescenčně značených rekombinantních proteinů NKR-P1B pozorována byla. Ovšem pouze v případě monomerních forem proteinu (nezávisle na přítomnosti krčku) a při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Z dosavadních výsledků se ale zdá, že k vazbě nedochází u všech buněk. U buněk exprimujících MHC glykoproteiny II. třídy byl signál slabší, což by mohlo ukazovat například na nižší expresi proteinu Clr-b na jejich povrchu. Do budoucích experimentů bude tedy pravděpodobně zahrnuta fenotypizace buněčných populací podle toho, kde k interakci proteinů dochází, kde je slabší, nebo kde zcela chybí.

Z výsledků získaných v rámci této diplomové práce vyplývá, že pokud k interakci mezi proteiny NKR-P1B a Clr-b dochází, účastní se jí zřejmě monomerní forma NKR-P1B a klíčová je její C-lektinová (ligand-vazebná) doména. Aby mohla být ale otázka struktury a interakce těchto proteinů zcela vyřešena, je potřeba zabývat se jejich studiem dál.

Mezi další metody, které by mohly být do budoucna k výzkumu interakce využity, patří rentgenostrukturní analýza, NMR spektroskopie a FRET. Protože není jasné, zda na vazbu proteinů nemá vliv také glykosylace (interakce proteinů NKp65 a KACL se účastní karbohydráty¹¹⁹), bylo by vhodné vazebné pokusy zopakovat s proteinem připraveným v savčím nebo hmyzím expresním systému.

7 SOUHRN

- Byly připraveny DNA konstrukty kódující ligand-vazebnou a celou extracelulární část proteinu NKR-P1B
- Byly nalezeny vhodné podmínky pro produkci a renaturaci obou forem rekombinantního proteinu NKR-P1B
- Na základě zjištěného zapojení disulfidických můstků a dat získaných chemickým zesíťením byly vytvořeny podle templátu proteinu NKR-P1A modely proteinu NKR-P1B
- Pomocí biochemických metod gelové filtrace a povrchové plazmonové rezonance nebyla zjištěna interakce proteinu NKR-P1B s jeho ligandem Clr-b
- Byla prokázána vazba fluorescenčně značeného monomerního NKR-P1B (v případě ligand-vazebné i celé extracelulární části proteinu) na diferencované buňky kostní dřeně

8 CITOVANÁ LITERATURA

1. Carlyle, J. R. *et al.* Missing self-recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3527–3532 (2004).
2. Kiessling, R., Klein, E. & 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.* **5**, 112–117 (1975).
3. Lanier, L. L. Shades of grey--the blurring view of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 73–74 (2013).
4. Horwitz, D. A. & Bakke, A. C. An Fc receptor-bearing, third population of human mononuclear cells with cytotoxic and regulatory function. *Immunol. Today* **5**, 148–153 (1984).
5. Ligthart, G. J., Schuit, H. R. & Hijmans, W. Subpopulations of mononuclear cells in ageing: expansion of the null cell compartment and decrease in the number of T and B cells in human blood. *Immunology* **55**, 15–21 (1985).
6. Spits, H. *et al.* Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 145–149 (2013).
7. Bezman, N. A. *et al.* Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **13**, 1000–1009 (2012).
8. Trinchieri, G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* **47**, 187–376 (1989).
9. Pende, D. *et al.* Identification and molecular characterization of Nkp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **190**, 1505–1516 (1999).
10. Sivori, S. *et al.* p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J. Exp. Med.* **186**, 1129–1136 (1997).
11. Moretta, L. *et al.* Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1205–1211 (2002).
12. Hayakawa, Y. & Smyth, M. J. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 1517–1524 (2006).
13. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* **22**, 633–640 (2001).
14. Yu, J., Freud, A. G. & Caligiuri, M. A. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* **34**, 573–582 (2013).
15. McClory, S. *et al.* Evidence for a stepwise program of extrathymic T cell development within the human tonsil. *J. Clin. Invest.* **122**, 1403–1415 (2012).
16. Becknell, B. & Caligiuri, M. A. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv. Immunol.* **86**, 209–239 (2005).
17. Kennedy, M. K. *et al.* Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* **191**, 771–780 (2000).
18. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H.-G. & Bryceson, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* **115**, 2167–2176 (2010).
19. Grzywacz, B. *et al.* Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human

- natural killer cells. *Blood* **108**, 3824–3833 (2006).
20. Kim, S. *et al.* In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat. Immunol.* **3**, 523–528 (2002).
 21. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells. *Blood* **112**, 461–469 (2008).
 22. Cooper, M. A. *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* **97**, 3146–3151 (2001).
 23. Koopman, L. A. *et al.* Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J. Exp. Med.* **198**, 1201–1212 (2003).
 24. Mailliard, R. B. *et al.* IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J. Exp. Med.* **202**, 941–953 (2005).
 25. Grégoire, C. *et al.* The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev.* **220**, 169–182 (2007).
 26. Elliott, J. M. & Yokoyama, W. M. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol.* **32**, 364–372 (2011).
 27. Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**, 675–678 (1986).
 28. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. & Brossay, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 239–252 (2012).
 29. Williams, K. J. N. *et al.* Poxvirus infection-associated downregulation of C-type lectin-related-b prevents NK cell inhibition by NK receptor protein-1B. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 4980–4991 (2012).
 30. Carayannopoulos, L. N., Naidenko, O. V., Fremont, D. H. & Yokoyama, W. M. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 4079–4083 (2002).
 31. Sivori, S. *et al.* CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10116–10121 (2004).
 32. Peters, P. J. *et al.* Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* **173**, 1099–1109 (1991).
 33. Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S. & Griffiths, G. M. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* **15**, 751–761 (2001).
 34. Susanto, O., Trapani, J. A. & Brasacchio, D. Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens* **80**, 477–487 (2012).
 35. Sutton, V. R. *et al.* Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1403–1414 (2000).
 36. Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H. & Ley, T. J. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* **76**, 977–987 (1994).
 37. Talanian, R. V. *et al.* Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J. Exp. Med.* **186**, 1323–1331 (1997).
 38. Kägi, D. *et al.* Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* **369**, 31–37 (1994).

39. Young, J. D., Cohn, Z. A. & Podack, E. R. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science* **233**, 184–190 (1986).
40. Kurschus, F. C., Fellows, E., Stegmann, E. & Jenne, D. E. Granzyme B delivery via perforin is restricted by size, but not by heparan sulfate-dependent endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13799–13804 (2008).
41. Froelich, C. J. *et al.* New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 29073–29079 (1996).
42. Pipkin, M. E. & Lieberman, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 301–308 (2007).
43. Fraser, S. A., Karimi, R., Michalak, M. & Hudig, D. Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 4150–4155 (2000).
44. Bird, C. H. *et al.* Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6387–6398 (1998).
45. Catalfamo, M. & Henkart, P. A. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 522–527 (2003).
46. Rousalova, I. & Krepela, E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *Int. J. Oncol.* **37**, 1361–1378 (2010).
47. Motyka, B. *et al.* Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* **103**, 491–500 (2000).
48. Kurschus, F. C., Bruno, R., Fellows, E., Falk, C. S. & Jenne, D. E. Membrane receptors are not required to deliver granzyme B during killer cell attack. *Blood* **105**, 2049–2058 (2005).
49. Weiner, L. M., Surana, R. & Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 317–327 (2010).
50. Seidel, U. J. E., Schlegel, P. & Lang, P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front. Immunol.* **4**, 76 (2013).
51. Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G. & Long, E. O. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* **107**, 159–166 (2006).
52. Hubert, P. *et al.* Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. *Cancer Res.* **71**, 5134–5143 (2011).
53. Imai, M., Landen, C., Ohta, R., Cheung, N.-K. V. & Tomlinson, S. Complement-mediated mechanisms in anti-GD2 monoclonal antibody therapy of murine metastatic cancer. *Cancer Res.* **65**, 10562–10568 (2005).
54. Lazar, G. A. *et al.* Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4005–4010 (2006).
55. Smyth, M. J. *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* **42**, 501–510 (2005).
56. Degli-Esposti, M. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 535–542 (1999).

57. Takeda, K. *et al.* Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.* **7**, 94–100 (2001).
58. Sato, K. *et al.* Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3138–3146 (2001).
59. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
60. Vivier, E. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**, 44–49 (2011).
61. Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L. & Vivier, E. Natural-killer cells and dendritic cells: 'l'union fait la force'. *Blood* **106**, 2252–2258 (2005).
62. Morandi, B., Bougras, G., Muller, W. A., Ferlazzo, G. & Münz, C. NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2394–2400 (2006).
63. Moretta, A., Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G. & Moretta, L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ.* **15**, 226–233 (2008).
64. Gerosa, F. *et al.* Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* **195**, 327–333 (2002).
65. Raulet, D. H. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat. Immunol.* **5**, 996–1002 (2004).
66. Winger, E. E. & Reed, J. L. The multiple faces of the decidual natural killer cell. *Am. J. Reprod. Immunol. New York N 1989* **70**, 1–9 (2013).
67. Zhang, B., Yamamura, T., Kondo, T., Fujiwara, M. & Tabira, T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1677–1687 (1997).
68. Cerboni, C. *et al.* Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK-cell lysis. *Blood* **110**, 606–615 (2007).
69. Bao, S. H. *et al.* Increased expression of Toll-like receptor 3 in decidual natural killer cells of patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **165**, 326–330 (2012).
70. Sánchez-Fueyo, A. & Strom, T. B. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology* **140**, 51–64 (2011).
71. Villard, J. The role of natural killer cells in human solid organ and tissue transplantation. *J. Innate Immun.* **3**, 395–402 (2011).
72. McNerney, M. E. *et al.* Role of natural killer cell subsets in cardiac allograft rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **6**, 505–513 (2006).
73. Ruggeri, L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097–2100 (2002).
74. De Maria, A. *et al.* Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur. J. Immunol.* **37**, 445–455 (2007).
75. García-León, J. A. *et al.* Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Spanish multiple sclerosis patients. *Mol. Immunol.* **48**, 1896–1902 (2011).

76. Søndergaard, H. B. *et al.* Alterations in KLRB1 gene expression and a Scandinavian multiple sclerosis association study of the KLRB1 SNPs rs4763655. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **19**, 1100–1103 (2011).
77. Van Belle, T. L. & von Herrath, M. G. The role of the activating receptor NKG2D in autoimmunity. *Mol. Immunol.* **47**, 8–11 (2009).
78. Tian, Z., Gershwin, M. E. & Zhang, C. Regulatory NK cells in autoimmune disease. *J. Autoimmun.* **39**, 206–215 (2012).
79. Aktas, E. *et al.* Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells. *Clin. Exp. Immunol.* **140**, 301–309 (2005).
80. Frenzel, L. & Hermine, O. Mast cells and inflammation. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **80**, 141–145 (2013).
81. Scordamaglia, F. *et al.* Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 479–485 (2008).
82. Mathias, C. B. *et al.* Pro-inflammatory Role of Natural Killer cells in the development of Allergic Airway Disease. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* (2014). doi:10.1111/cea.12271
83. Vivier, E., Nunès, J. A. & Vély, F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* **306**, 1517–1519 (2004).
84. Lanier, L. L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**, 495–502 (2008).
85. Tamir, I., Dal Porto, J. M. & Cambier, J. C. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 307–315 (2000).
86. Ravetch, J. V. & Lanier, L. L. Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84–89 (2000).
87. Berisio, R., Ciccarelli, L., Squeglia, F., De Simone, A. & Vitagliano, L. Structural and dynamic properties of incomplete immunoglobulin-like fold domains. *Protein Pept. Lett.* **19**, 1045–1053 (2012).
88. Fowler, S. B. & Clarke, J. Mapping the Folding Pathway of an Immunoglobulin Domain: Structural Detail from Phi Value Analysis and Movement of the Transition State. *Structure* **9**, 355–366 (2001).
89. Colonna, M., Moretta, A., Vély, F. & Vivier, E. A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunol. Today* **21**, 428–431 (2000).
90. Lanier, L. L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225–274 (2005).
91. Campbell, K. S. & Hasegawa, J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 536–544 (2013).
92. Carrington, M. & Alter, G. Innate immune control of HIV. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a007070 (2012).
93. Martin, M. P. & Carrington, M. Immunogenetics of HIV disease. *Immunol. Rev.* **254**, 245–264 (2013).
94. Hecht, M.-L. *et al.* Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J. Proteome Res.* **8**, 712–720 (2009).
95. Koch, J., Steinle, A., Watzl, C. & Mandelboim, O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol.* **34**, 182–191 (2013).
96. Kaifu, T., Escalière, B., Gastinel, L. N., Vivier, E. & Baratin, M. B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **68**, 3531–3539 (2011).
97. Binici, J. *et al.* A soluble fragment of the tumor antigen BCL2-associated

- athanogene 6 (BAG-6) is essential and sufficient for inhibition of NKp30-dependent cytotoxicity of natural killer cells. *J. Biol. Chem.* (2013). doi:10.1074/jbc.M113.483602
98. Zelensky, A. N. & Gready, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* **272**, 6179–6217 (2005).
99. Bartel, Y., Bauer, B. & Steinle, A. Modulation of NK Cell Function by Genetically Coupled C-Type Lectin-Like Receptor/Ligand Pairs Encoded in the Human Natural Killer Gene Complex. *Front. Immunol.* **4**, 362 (2013).
100. Giorda, R. & Trucco, M. Mouse NKR-P1. A family of genes selectively coexpressed in adherent lymphokine-activated killer cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **147**, 1701–1708 (1991).
101. Plougastel, B., Matsumoto, K., Dubbelde, C. & Yokoyama, W. M. Analysis of a 1-Mb BAC contig overlapping the mouse Nkrp1 cluster of genes: cloning of three new Nkrp1 members, Nkrp1d, Nkrp1e, and Nkrp1f. *Immunogenetics* **53**, 592–598 (2001).
102. Kveberg, L. *et al.* Two major groups of rat NKR-P1 receptors can be distinguished based on chromosomal localization, phylogenetic analysis and Clr ligand binding. *Eur. J. Immunol.* **39**, 541–551 (2009).
103. Kveberg, L. *et al.* Phylogenetic and functional conservation of the NKR-P1F and NKR-P1G receptors in rat and mouse. *Immunogenetics* **63**, 429–436 (2011).
104. Carlyle, J. R. *et al.* Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1 alloreactivity of mouse NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 7511–7524 (2006).
105. Appasamy, P. M., Kenniston, T. W., Brissette-Storkus, C. S. & Chambers, W. H. NKR-P1dim/TCR alpha beta + T cells and natural killer cells share expression of NKR-P1A and NKR-P1D. *Nat. Immun.* **15**, 259–268 (1996).
106. Aust, J. G., Gays, F., Mickiewicz, K. M., Buchanan, E. & Brooks, C. G. The expression and function of the NKR-P1 receptor family in C57BL/6 mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 106–116 (2009).
107. Hao, L., Klein, J. & Nei, M. Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3192–3197 (2006).
108. Kolenko, P. *et al.* Molecular architecture of mouse activating NKR-P1 receptors. *J. Struct. Biol.* **175**, 434–441 (2011).
109. Rozbesky, D. *et al.* Chemical cross-linking and H/D exchange for fast refinement of protein crystal structure. *Anal. Chem.* **84**, 867–870 (2012).
110. Rozbesky, D. *et al.* Structural model of lymphocyte receptor NKR-P1C revealed by mass spectrometry and molecular modeling. *Anal. Chem.* **85**, 1597–1604 (2013).
111. Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H. & Yokoyama, W. M. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR-P1 family of natural killer cell receptors. *Nat. Immunol.* **4**, 801–807 (2003).
112. Chen, P. *et al.* Analysis of the mouse 129-strain Nkrp1-Clr gene cluster reveals conservation of genomic organization and functional receptor-ligand interactions despite significant allelic polymorphism. *Immunogenetics* **63**, 627–640 (2011).
113. Zhang, Q. *et al.* Mouse Nkrp1-Clr gene cluster sequence and expression analyses reveal conservation of tissue-specific MHC-independent

- immunosurveillance. *PloS One* **7**, e50561 (2012).
114. Carlyle, J. R. *et al.* Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 5917–5923 (1999).
115. Carlyle, J. R. *et al.* Evolution of the Ly49 and Nkrp1 recognition systems. *Semin. Immunol.* **20**, 321–330 (2008).
116. Skálová, T. *et al.* Mouse Clr-g, a ligand for NK cell activation receptor NKR-P1F: crystal structure and biophysical properties. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 4881–4889 (2012).
117. Voigt, S. *et al.* Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKR-P1B:Clr-b missing-self axis. *Immunity* **26**, 617–627 (2007).
118. Fine, J. H. *et al.* Chemotherapy-induced genotoxic stress promotes sensitivity to natural killer cell cytotoxicity by enabling missing-self recognition. *Cancer Res.* **70**, 7102–7113 (2010).
119. Li, Y., Wang, Q., Chen, S., Brown, P. H. & Mariuzza, R. A. Structure of NKp65 bound to its keratinocyte ligand reveals basis for genetically linked recognition in natural killer gene complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11505–11510 (2013).
120. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
121. Hanč, P. Výzkum vzájemné interakce membránových receptorů NKR-P1D a Clrb. *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta* (2011).
122. Young, M. M. *et al.* High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5802–5806 (2000).
123. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
124. Goss, G. G., Adamia, S. & Galvez, F. Peanut lectin binds to a subpopulation of mitochondria-rich cells in the rainbow trout gill epithelium. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281**, R1718–1725 (2001).
125. Hanč, P. Rekombinantní exprese receptorů myších zabíječských buněk mNKR-P1D a mClrb. *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta* (2009).
126. Rozbeský, D. Rekombinantní exprese a studium receptorů mNKR-P1A a C. *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta* (2009).
127. Adámek, D. Příprava rekombinantních forem extracelulární domény myších leukocytárních receptorů z rodiny NKR-P1. *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta* (2012).
128. Webová stránka proteinu NKR-P1B. *UniProt* (2014). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/P27812>>
129. Back, J. *et al.* Distinct conformations of Ly49 natural killer cell receptors mediate MHC class I recognition in trans and cis. *Immunity* **31**, 598–608 (2009).
130. Zelensky, A. N. & Gready, J. E. Comparative analysis of structural properties of the C-type-lectin-like domain (CTLD). *Proteins* **52**, 466–477 (2003).

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Optimalizace renaturace proteinu NKR-P1B

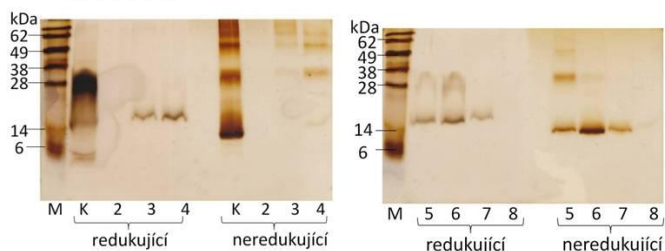
Příloha 2: Tkáňové řezy značené rekombinantními proteiny NKR-P1B
s fluorescenční sondou

Příloha 1: Optimalizace renaturace proteinu NKR-P1B

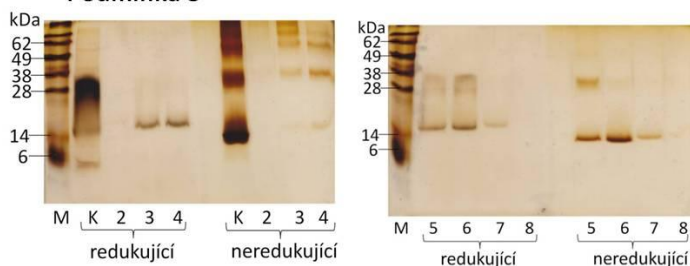
Byly testovány čtyři různé podmínky pro renaturaci ligand-vazebné a celé extracelulární části proteinu NKR-P1B. Výsledky zbylých elektroforetických analýz, jež nejsou uvedeny v kapitole 5.4.1, jsou na obrázku níže.

A. Ligand-vazebná část NKR-P1B

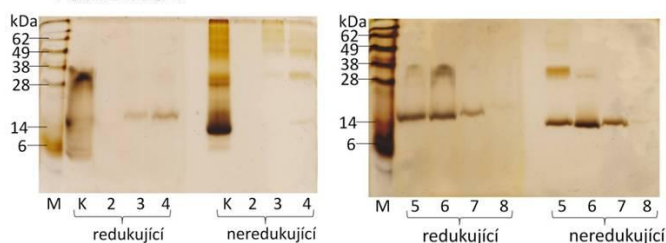
Podmínka B



Podmínka C

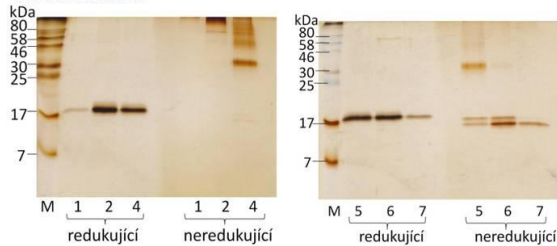


Podmínka D

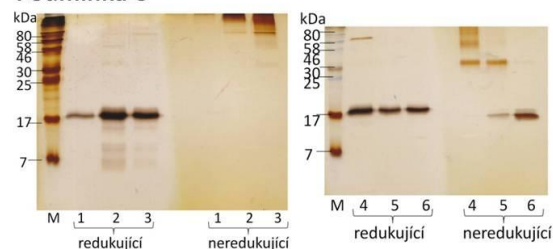


B. Celá extracelulární část NKR-P1B

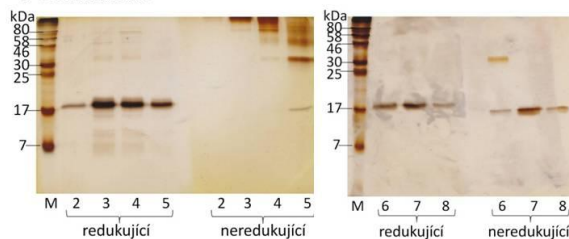
Podmínka B



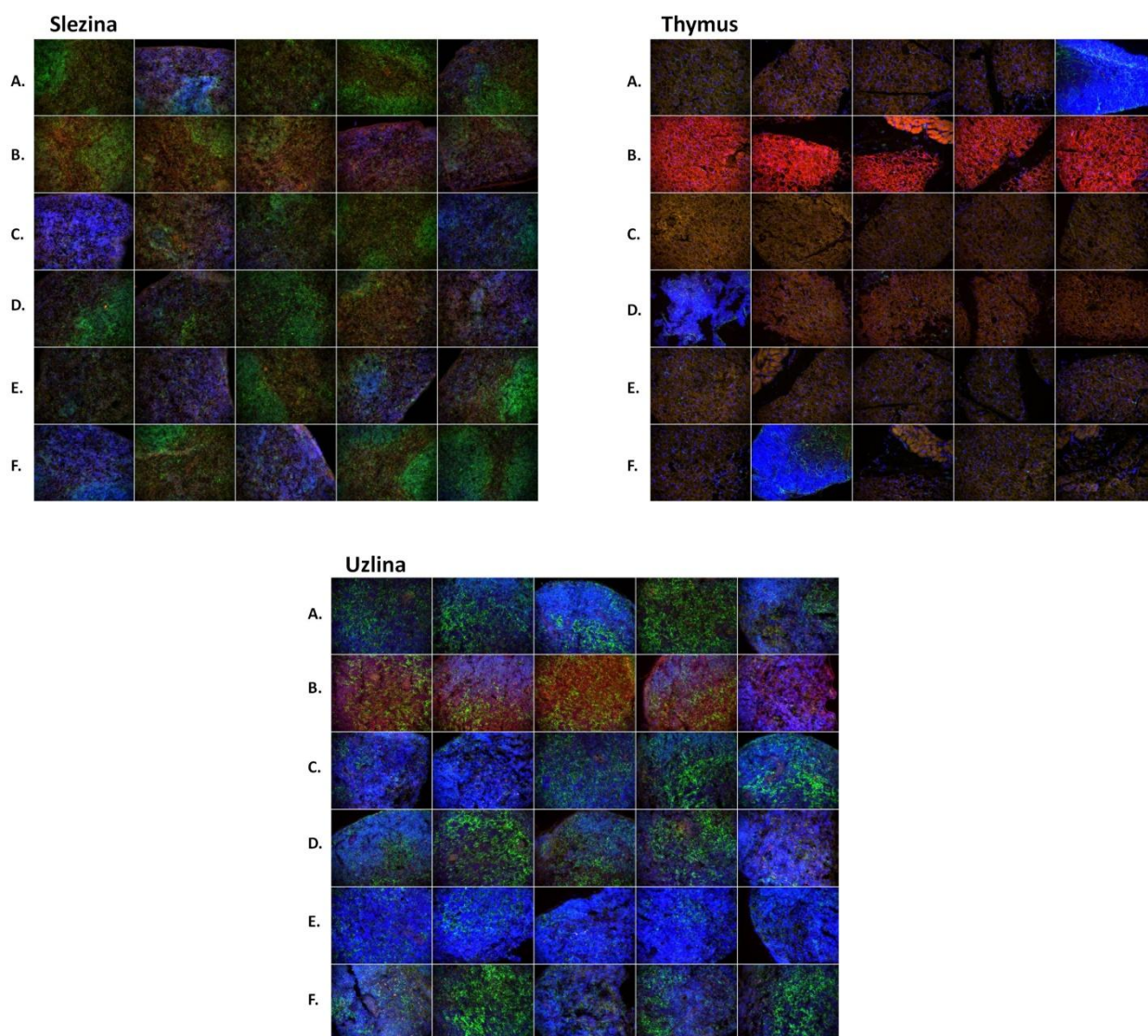
Podmínka C



Podmínka D



Příloha 2: Tkáňové řezy značené rekombinantními proteiny NKR-P1B s fluorescenční sondou



Kryořezy myší sleziny, thymu a uzliny značené pouze monomerními formami rekombinantních proteinů NKR-P1B s fluorescenční sondou.

A. Monomerní forma celé extracelulární části proteinu, koncentrace 0,1 µg/ml; ***B.*** Monomerní forma celé extracelulární části proteinu, koncentrace 1 µg/ml; ***C.*** Ligand-vazebná část proteinu, koncentrace 0,1 µg/ml; ***D.*** Ligand-vazebná část proteinu, koncentrace 1 µg/ml; ***E.*** Negativní kontrola; ***F.*** Pozitivní kontrola.

Každý preparát byl vyfocen pětikrát, snímky jsou řazeny vedle sebe do řádku. Zelená barva značí buňky exprimující MHC glykoproteiny II. třídy, modrá jádra, červená rekombinantní proteiny NKR-P1B (případně *peanut* lektin v pozitivní kontrole). Nejsilnější červený signál je patrný v řádcích B, tedy tkáních značených celou extracelulární částí proteinu o koncentraci 1 µg/ml.