

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Biofyzikální chemie



Kristián Skála

Studium extracelulární části myšního receptoru Nkr-p1b
přirozených zabíječských buněk pomocí NMR

NMR study of the extracellular part of the mouse Nkr-p1b receptor from natural
killer cells

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Josef Chmelík, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Eliška Pospíšilová

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Mgr. Josefa Chmelíka, Ph.D. a konzultantky Mgr. Elišky Pospíšilové a všechny použité prameny jsem řádně citoval. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Kristián Skála

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Josefu Chmelíkovi, Ph.D. za jeho vstřícnost při zpracovávání této diplomové práce a zvláště za provedení NMR experimentů. Zároveň děkuji své konzultantce Mgr. Elišce Pospíšilové za trpělivost, ochotu a všechny praktické rady při řešení práce. Dále děkuji ostatním členům laboratoře Strukturní biologie a buněčné signalizace za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu poradit. Můj dík patří také Tatsianě Charnavets, Ph.D. z Biotechnologického ústavu AV ČR za provedení experimentů cirkulárního dichroismu a dynamického rozptylu světla a RNDr. Danu Kavanovi, Ph.D. za provedení experimentu hmotnostní spektrometrie. Na závěr děkuji své rodině a přátelům za neustálou podporu v době mého studia.

Práce byla podporována grantovou agenturou Univerzity Karlovy (UNCE 204025/2012), Operační program Praha - Konkurenceschopnost (OPPK CZ.2.16/3.1.00/24023) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LO1509).

Abstrakt

Protein Nkr-p1b je povrchový receptor cytotoxických NK buněk, který zprostředkovává inhibiční signál vůči buňkám tělu vlastním. V rámci této práce byla pomocí rekombinantní exprese v buňkách *E. coli* připravena ligand vazebná doména myšního proteinového receptoru Nkr-p1b (mNkr-p1b LBD), která byla následně použita pro NMR strukturní analýzu. Pomocí třech různých metod (CD, PSIPRED a TALOS) bylo určeno zastoupení sekundárních struktur v molekule proteinu. Získané procentuální zastoupení sekundárních struktur přibližně odpovídá struktuře CTLD domény, která je důležitá pro vazbu ligandu, a tedy funkci receptoru Nkr-p1b. Daný protein se podařilo připravit ve formě vhodné pro NMR experimenty. Na základě dat získaných analýzou NMR spekter byl vytvořen předběžný model struktury proteinu mNkr-p1b LBD. Pro přesnější učení 3D struktury však ještě bude v dalších fázích potřeba vyhodnotit další NMR spektra, a upřesnit tak polohu jednotlivých atomů v molekule proteinu. Rozluštění struktury LBD domény proteinu mNkr-p1b by mohlo pomoci lépe pochopit komplexní mechanismus aktivace NK buněčné cytotoxické aktivity, a tím přispět k jejímu řízenému využití jako terapeutika proti některým virovým a nádorovým onemocněním.

Klíčová slova: Nkr-p1b, NK buňky, CTLD, rekombinantní exprese proteinů, renaturace, purifikace proteinů, strukturní analýza, NMR, CD, DLS

Abstract

Protein Nkr-p1b is a surface receptor of cytotoxic NK cells, that mediates inhibitory signal toward the body's own cells. In this study, the ligand binding domain of the mouse protein receptor Nkr-p1b (mNkr-p1b LBD) was prepared by recombinant expression in *E. coli* cells. Isolated protein was subsequently used for NMR structural analysis. Prediction of protein secondary structures ratio was carried out using three different methods (CD, PSIPRED and TALOS). Results correlate well with the structure of CTLD domain, that plays a key role in ligand binding and thus to function of Nkr-p1b receptor. We managed to prepare this protein in a form suitable for NMR experiments. Based on the data obtained by NMR spectra analysis, a preliminary model of the mNkr-p1b LBD protein structure was created. However, for more precise learning of the 3D structure accurate positions of individual atoms need to be determined by other NMR spectra evaluation in the next phase. Explaining the structure of the ligand binding domain of mNkr-p1b protein could help to better understand the complex mechanism of activation of NK cell cytotoxic activity, thereby contributing to its controlled use as a therapeutic against some viral and tumor diseases.

Key words: Nkr-p1b, NK cells, CTLD, recombinant protein expression, renaturation, protein purification, structural analysis, NMR, CD, DLS

Obsah

1	Teoretický úvod	12
1.1	Proteiny a jejich struktura	12
1.1.1	Přírozeně nestrukturované proteiny	16
1.1.2	Skládání proteinů	17
1.1.3	Příprava rekombinantních proteinů	18
1.2	Metody určování trojrozměrné struktury proteinů.....	20
1.2.1	Rentgenová krystalografie	21
1.2.2	Kryo-elektronová mikroskopie	22
1.2.3	Nukleární magnetická rezonance.....	23
1.2.3.1	NMR aktivní jádra a izotopové obohacení.....	24
1.2.3.2	Vzorek pro NMR experimenty	25
1.2.3.3	Zpracování experimentálních dat	26
1.2.3.4	NMR v pevné fázi	27
1.2.4	Dynamický rozptyl světla	27
1.2.5	Cirkulární dichroismus	28
1.3	mNkr-p1b a jeho role v organismu.....	29
1.3.1	NK buňky a jejich receptory	29
1.3.1.1	Imunoglobuliny	29
1.3.1.2	C-lektiny	30
1.3.2	Rodina Nkr-p1 receptorů	31
1.3.3	Nkr-p1b.....	32
2	Cíle práce	34
3	Materiál.....	35
3.1	Přístroje a pomůcky	35
3.2	Chemikálie	36
3.3	Roztoky a pufry	37
3.4	Kultivační média.....	38
3.5	Bakteriální kmen.....	39
3.6	Vektor.....	39
4	Metody	40
4.1	SDS elektroforéza	40
4.1.1	Příprava vzorků pro SDS elektroforézu.....	40
4.1.2	Provedení SDS elektroforézy.....	41
4.1.3	Vizualizace proteinů v polyakrylamidovém gelu	41

4.2	Rekombinantní exprese proteinu mNkr-p1b.....	42
4.2.1	Transformace kompetentních buněk.....	43
4.2.2	Výběr produkčního klonu	43
4.2.3	Optimalizace produkčních podmínek v M9 minimálním médiu	43
4.2.4	Produkce proteinu v M9 minimálním médiu a izolace inkluzních tělísek	44
4.2.5	Produkce izotopově značeného proteinu	45
4.3	Renaturace proteinu	45
4.4	Gelová filtrace.....	46
4.5	Optimalizace stability proteinového vzorku	47
4.6	Stanovení koncentrace proteinů.....	47
4.7	Dynamický rozptyl světla	47
4.8	Vyhodnocení NMR spekter.....	48
4.8.1	2D- ¹ H, ¹⁵ N-HSQC experiment	48
4.8.2	3D- ¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N-experimenty.....	48
4.8.3	Metody přiřazení signálů jednotlivým atomům.....	49
4.8.3.1	Metody přiřazení uhlíků C ^α , C ^β a C'	51
4.8.3.2	Metody přiřazení signálů atomům aminokyselinových zbytků.....	53
4.9	Metody určení zastoupení sekundárních struktur	53
4.10	Určení modelu trojrozměrné struktury	54
5	Výsledky	55
5.1	Výběr vhodného produkčního klonu	55
5.2	Optimalizace produkčních podmínek	55
5.3	Příprava ¹³ C, ¹⁵ N značeného proteinu.....	57
5.3.1	Renaturace a dialýza	58
5.3.2	Purifikace proteinu pomocí gelové filtrace.....	59
5.3.3	Optimalizace stability proteinu ve vzorku	61
5.4	Výsledek experimentu DLS.....	64
5.5	Výsledky vyhodnocení NMR spekter.....	65
5.5.1	Výsledky ¹ H, ¹⁵ N-HSQC experimentu	65
5.5.2	Přiřazení signálů jednotlivým atomům	66
5.6	Určení zastoupení sekundárních struktur.....	69
5.7	Trojrozměrný model mNkr-p1b LBD.....	72
6	Diskuze	73
7	Závěr	76
8	Seznam literatury	77
9	Přílohy.....	86

Seznam zkratek

AA	aminokyselina (<i>amino acid</i>)
APS	peroxodisíran amonný (<i>ammonium persulfate</i>)
A	agregáty proteinu mNkr-p1b LBD
C'	karbonylový uhlík proteinové páteře
C ^α	α uhlík aminokyselin proteinové páteře
C ^β	β uhlík aminokyselinového zbytku
CBB	<u>C</u> oomassie <u>B</u> rilliant <u>B</u> lue
CBCA(CO)NH	3D NMR experiment pro přiřazení signálů C ^α a C ^β uhlíkům proteinové páteře
CD	cirkulární dichroismus
CD94/NKG2	heterodimer receptoru NKG2 s receptorem CD94 (receptory NK buněk obsahující CTLD doménu)
CDNN	software pro predikci zastoupení sekundárních struktur (<i>Circular dichroism neural network</i>)
CLEC5A	C-lektinový receptor makrofágů (<i>C-type lectin domain family 5 member A</i>)
Clr	protein asociovaný s C-lektiny (<i>C-type lectin related/ C-type lectin-like receptor</i>)
CryoEM	kryoelektronová mikroskopie (<i>Cryo-electron microscopy</i>)
CryoET	kryoelektronová tomografie (<i>Cryo-electron tomography</i>)
CTLD	doména C-lektinového typu (<i>C-type lectin-like domain</i>)
D	dimer proteinu mNkr-p1b LBD
DLS	dynamický rozptyl světla (<i>Dynamic light scattering</i>)
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FcR _γ	Fc receptor obsahující ITIM motiv (<i>Fragment crystallizable receptor</i>)
FID	volné doznívání magnetické indukce (<i>Free induction decay</i>)
GenMR	software pro tvorbu NMR struktur (<i>Generate NMR structure</i>)

GF	gelová filtrace
(H)CC(CO)NH	3D NMR experiment pro přiřazení signálů uhlíkům postranních řetězců proteinu
H(CC)(CO)NH	3D NMR experiment pro přiřazení signálů vodíkům postranních řetězců proteinu
HCCH-TOCSY	3D NMR experiment pro přiřazení signálů vodíkům postranních řetězců proteinu
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethylen) 1-piperazinethansulfonová (<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HNCA	3D NMR experiment pro přiřazení signálů C ^α uhlíkům proteinové páteře
HNCACB	3D NMR experiment pro přiřazení signálů C ^α a C ^β uhlíkům proteinové páteře
HN(CA)CO	3D NMR experiment pro přiřazení signálů karbonylovým uhlíkům (C') proteinové páteře
HNCO	3D NMR experiment pro přiřazení signálů karbonylovým uhlíkům (C') proteinové páteře
HN(CO)CA	3D NMR experiment pro přiřazení signálů C ^α uhlíkům proteinové páteře
HN-TOCSY-HSQC	3D NMR experiment pro přiřazení signálů vodíkům postranních řetězců proteinu
HSP	proteiny teplotního šoku (<i>Heat shock proteins</i>)
HSQC	2D NMR experiment (<i>Heteronuclear single quantum coherence</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>)
KIR	imunoglobulinové receptory NK buněk (<i>Killer cell immunoglobulin-like receptor</i>)
KLR	receptory NK buněk obsahující CTLD doménu (<i>Killer cell lectin-like receptor</i>)
LB (médium/agar)	médium/ agar bohaté/ý na živiny (<i>Lysogeny broth</i>)
Lck	tyrosin kináza specifická pro lymfocyty (<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>)

LIR	imunoglobulinové receptory NK buněk (<i>Leukocyte immunoglobulin-like receptors</i>)
LLT1	C-lektinový ligand lidského NKR-P1A (<i>Lectin like transcript 1</i>)
Lox1	C-lektinový receptor dendritických buněk (<i>lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1</i>)
Ly-49	receptory NK buněk obsahující CTLD doménu (<i>Lymphocyte antigen 49</i>)
M	monomer proteinu mNkr-p1b LBD
M9mm	M9 minimální médium
MAD	anomální disperze rentgenového záření o různých vlnových délkách (<i>Multi-wavelength anomalous dispersion</i>)
MCMV	myší cytomegalovirus (<i>Murine cytomegalovirus</i>)
MHC glykoproteiny	hlavní histokompatibilitní komplex (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MicroED	kryoelektronová mikroskopie využívající jako vzorek proteinové mikrokrystaly (<i>Micro-electron diffraction</i>)
mNkr-p1b LBD	ligand vazebná doména (<i>ligand binding domain</i>) myšího receptoru Nkr-p1b
NCR	imunoglobulinové receptory NK buněk (<i>Natural killer cell receptor</i>)
NK (buňky)	přirozené zabíječské buňky (<i>Natural killer cells</i>)
NKG2D	aktivační NK buněčný receptor (<i>Natural killer group 2 receptor D</i>)
Nkp65	aktivační receptor lidských NK buněk (<i>Nature killer protein 65</i>)
Nkr-p1	rodina NK buněčných receptorů proteinu 1 obsahující CTLD doménu (<i>family of Natural killer cell receptors protein 1</i>)
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOE	nukleární Overhauserův efekt (<i>Nuclear Overhauser effect</i>)
NOESY	2D NMR experiment využívající NOE pro určení mezijaderných vzdáleností sousedících jader (<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
OD ₆₀₀	optická denzita měřená při 600 nm
PBS	fosfátový pufr (<i>Phosphate buffer solution</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase chain reaction</i>)

PDB	databáze strukturních dat biologických makromolekul (<i>Protein data bank</i>)
PIPES	kyselina piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonová] (<i>piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid (<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PSIPRED	software pro predikci zastoupení sekundárních struktur (<i>Protein structure prediction</i>)
RCMV	potkaní cytomegalovirus (<i>Rat cytomegalovirus</i>)
RCTL	protein podobný C-lektinům využívaný potkaním cytomegalovirem (<i>RCMV C-type lectin-like protein</i>)
SDS	dodecylsírán sodný (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SH-2	Sarkom homologní doména 2 (<i>Sarcoma homology 2 domain</i>)
SHP-1	Sarkom homologní doména 2 obsahující fosfatázu (<i>Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>)
TALOS	software pro predikci zastoupení sekundárních struktur (<i>Torsion angle likeliness obtained from shift and sequence similarity</i>)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TOCSY	typ NMR experimentu (<i>Total correlation spectroscopy</i>)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
% v/v	objemová procenta
% w/w	hmotnostní procenta
X-ray krystalografie	rentgenová krystalografie

1 Teoretický úvod

První část této kapitoly shrnuje obecné poznatky o proteinech a jejich struktuře, druhá část se pak věnuje metodám studia jejich struktury (zde je největší pozornost věnována metodě nukleární magnetické rezonance) a třetí část teoretického úvodu se zaměřuje na studovaný protein mNkr-p1b.

1.1 Proteiny a jejich struktura

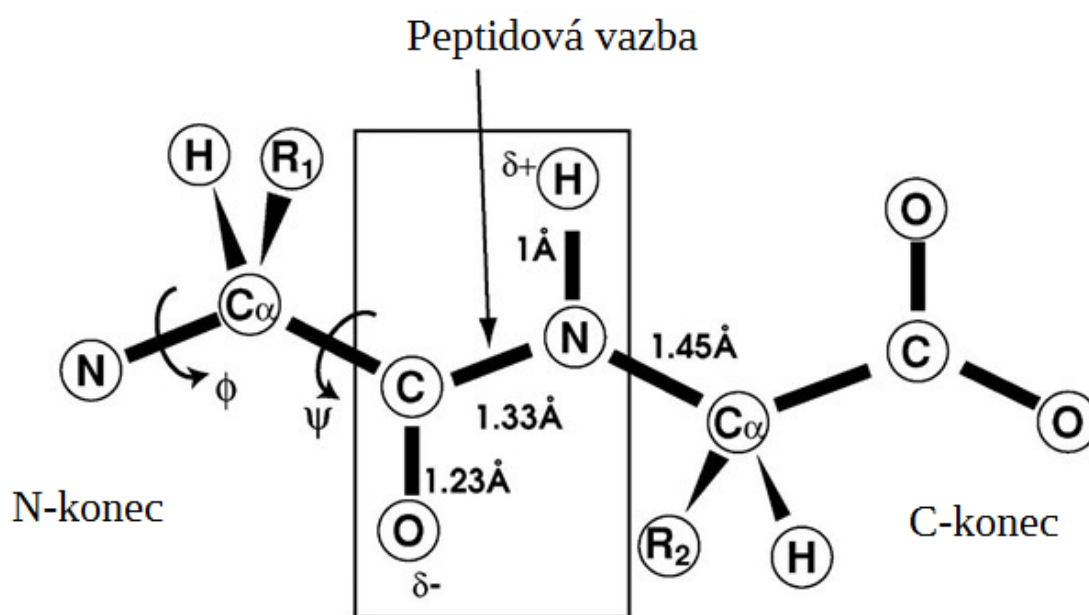
Proteiny (bílkoviny) jsou lineární biomakromolekuly vznikající v ribozomech kondenzací aminokyselin za vzniku peptidové vazby. Tento proces se nazývá translace. Translace je překlad nukleotidové sekvence z mediátorové RNA (která vzniká transkripcí/přepisem z DNA) do sekvence aminokyselin. Proteiny jsou vysoce komplexní makromolekuly, liší se velikostí, funkcí, strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi^{1,2}.

Základní kostru všech proteinů tedy tvoří řetězec aminokyselin. Proteiny mohou být ale tvořeny i dalšími neaminokyselinovými strukturami (např. sacharidy, mastnými kyselinami, zbytky kyseliny fosforečné nebo dusičné apod.). Tyto bývají ke kostře proteinu často připojovány až dodatečně tzv. posttranslačními modifikacemi (glykosylace, fosforylace, palmitoylace, tvorba disulfidických vazeb). K molekule proteinu mohou být posttranslačně vázány (kovalentně či nekovalentně) také tzv. kofaktory, které jsou nezbytné pro funkci enzymů. Patří mezi ně například biotin, hem, kobalamin, flavinadenin dinukleotid nebo ionty kovů. Každá z těchto posttranslačních modifikací pozměňuje fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly proteinu, a tím může ovlivnit jeho aktivitu, stabilitu nebo dokonce funkci^{2,3}.

Proteiny jsou jednou ze základních stavebních složek všech živých organismů, hrají nezastupitelnou roli v buněčných procesech bakterií, rostlin, hub i zvířat, včetně člověka. Lidské tělo obsahuje přibližně 18 % (w/w) proteinů⁴. Význam proteinů ale neleží v jejich vysokém zastoupení v organismu. Některé z nejdůležitějších proteinů, jako jsou například hormony nebo enzymy, se naopak v těle vyskytují jen v nepatrných koncentracích, a přesto jsou nezbytné pro jeho správné fungování. Funkce proteinů v lidském organismu jsou velmi různorodé: plní funkci stavební, působí jako katalyzátory biochemických reakcí (enzymy), účastní se buněčné signalizace, imunitní odpovědi, přenosu nervových vzruchů, podílejí se také na uchovávání (skladování) a přenosu jiných molekul. Ačkoliv se většina proteinů skládá pouze z dvaceti základních α -aminokyselin, různorodost jejich vlastností je

neuvěřitelně široká a s novými objevy se naše znalosti vlastností a funkcí proteinů neustále rozšiřují^{1,3}.

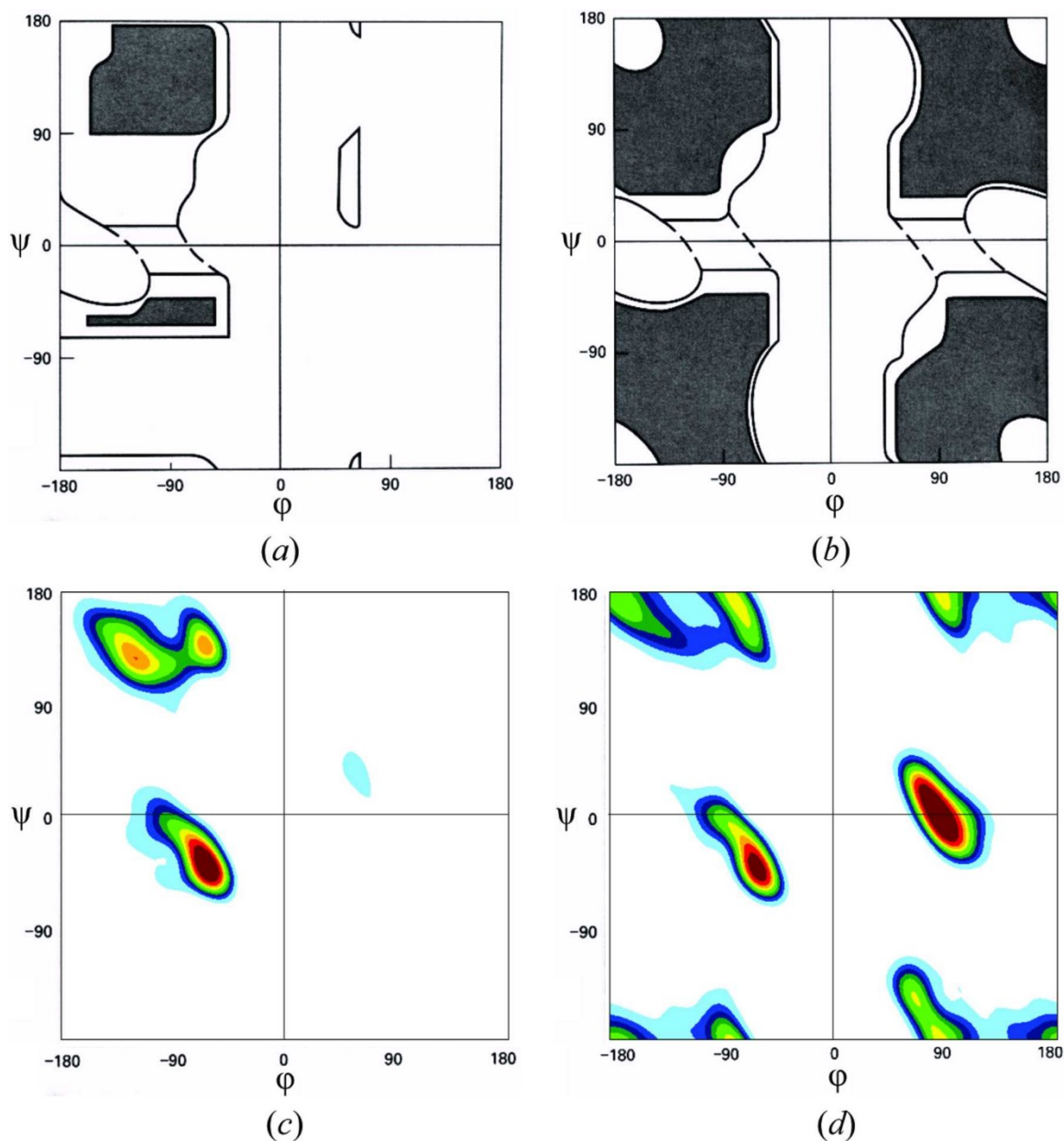
Obrázek 1 znázorňuje uspořádání peptidové vazby proteinů. Tato vazba má částečně charakter dvojné vazby, a delokalizace π elektronů tak zabraňuje rotaci atomů kolem osy peptidové vazby. Vazby v oblasti α -uhlíku jsou však flexibilní a rotace v jejich okolí je definována tzv. torzními úhly (Φ , Ψ). Tyto úhly v peptidové vazbě pak určují sekundární strukturu proteinové páteře⁵.



Obr. 1. Páteř polypeptidu s vyznačenou rovinou peptidové vazby a úhly Φ a Ψ . Převzato a upraveno dle¹³⁶.

Dovolené konformace polypeptidového řetězce v závislosti na úhlech Φ a Ψ vymezuje tzv. Ramachandranův výnos (obr. 2, str. 14). Je založen na pozorování, že jednotlivé aminokyseliny zaujímají vždy pouze určité preferované konformace. To je dáno van der Waalsovými poloměry atomů, které udávají nejbližší možnou vzdálenost, na kterou se mohou atomy přiblížit. Použití torzních úhlů proteinové páteře jako proměnné umožňuje analýzu trojrozměrné struktury ve dvou rozměrech^{6,7}. Každá aminokyselina má svůj charakteristický Ramachandranův výnos. Nejznámější je diagram pro alanin (obr. 2a), který je často používán jako modelový pro všechny aminokyseliny (obr. 2c) kromě glycinu (glycin má více konformačních možností z důvodu absence postranního řetězce; obr. 2b,d). Experimentální data ukazují, že některé aminokyseliny mají zakázané kombinace vazebných úhlů (nacházejí se v tzv. zakázaných regionech, mimo povolené kombinace vazebných úhlů). Jedná se přibližně o 0,4 % aminokyselin nepočítaje glycin. Nejvíce se v zakázaných

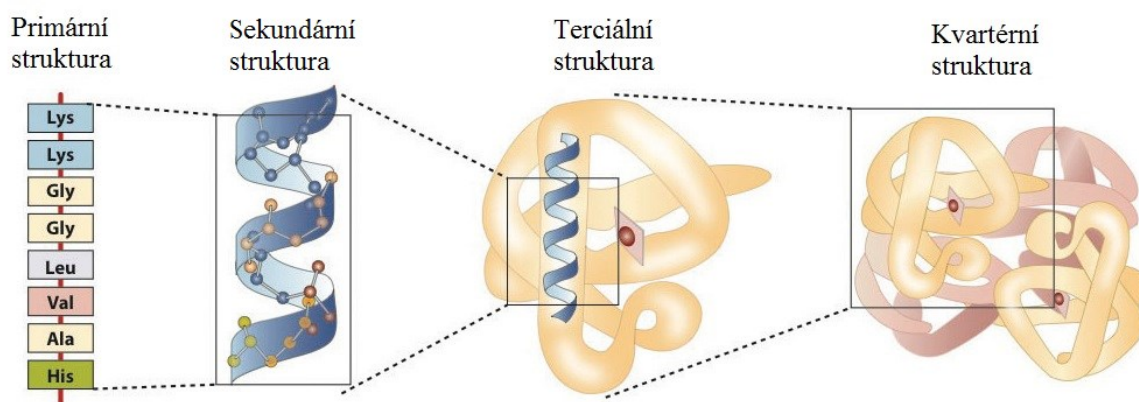
oblastech vyskytují serin, cystein, asparagin, threonin a histidin. Aminokyseliny v zakázaných konformačních oblastech jsou obvykle umístěné blízko povrchu molekuly proteinu a v krátkých ohybech, které se často nachází na rozhraní mezi dvěma prvky sekundární struktury^{8,9}.



Obr. 2. Ramachandranův výnos pro a) alanin (teoretický), b) glycin (teoretický), c) všech 19 základních aminokyselin (bez glycinu) (experimentální), d) glycin (experimentální). Tmavé plochy na diagramech a) a b) vyznačují oblasti s nejvyšší pravděpodobností konformace peptidového řetězce v okolí dané aminokyseliny. Na diagramech c) a d) je nejvyšší výskyt konformací zobrazen červeně. Převzato z⁸.

V biochemii jsou rozlišovány čtyři úrovně struktury proteinů⁵ (obr. 3):

- **Primární struktura.** Primární strukturou je sekvence aminokyselin v polypeptidovém řetězci.
- **Sekundární struktura.** Jako sekundární struktura jsou označovány pravidelně se opakující lokální struktury stabilizované vodíkovými můstky. Mezi nejběžnější struktury patří α -helix, β -skládaný list a ohyby. Protože jsou sekundární struktury pouze lokální, mohou se vyskytovat v různých kombinacích v rámci jednoho proteinu.
- **Terciální struktura.** Terciální strukturou se rozumí celkový tvar molekuly proteinu, vzájemné uspořádání sekundárních struktur. Terciální struktura je stabilizována hydrofobními interakcemi, pomocí solných můstků, vodíkových vazeb, disulfidových můstků nebo posttranslačními modifikacemi.
- **Kvartérní struktura.** Kvartérní struktura vzniká spojením několika molekul proteinů (proteinových podjednotek) a tvoří proteinový komplex⁵.



Obr. 3. Čtyři základní úrovně struktury proteinů. Převzato a upraveno dle³.

Proteiny ale nejsou zcela rigidní molekuly. Kromě toho, že rozlišujeme tyto čtyři základní typy struktury proteinů, mohou tyto molekuly v rámci plnění své funkce přecházet mezi několika různými stavy. V souvislosti s těmito strukturně-funkčními změnami v rámci molekuly proteinu jsou různé terciální a kvartérní struktury označovány jako „konformace“ a přechody mezi nimi se nazývají konformační změny. K těmto změnám zpravidla dochází například při navázání specifického ligandu do aktivního místa enzymu¹⁰.

Proteiny lze rozdělit na tři základní skupiny podle typu terciální struktury na globulární, fibrilární a membránové. Globulární proteiny jsou většinou rozpustné a často mají enzymovou aktivitu nebo plní funkci transportní (např. hemoglobin, albumin). Fibrilární proteiny mají většinou stavební funkci (např. kolagen, keratin) a membránové proteiny většinou slouží jako receptory nebo vytváří kanály pro průchod polárních a nabitých molekul skrz buněčnou membránu (např. receptory spřažené s G-proteiny, akvaporiny). Mnohé proteiny však nelze jednoznačně zařadit ani do jedné z těchto skupin, mohou totiž být tvořeny kombinací těchto tří základních terciálních struktur. V dnešní době se někdy hovoří o čtvrté skupině proteinů, a to tzv. „přirozeně neuspořádaných“ nebo „nestrukturovaných“ proteinech^{10,11}.

1.1.1 Přirozeně nestrukturované proteiny

Obecně je dnes přijímán názor, že funkce proteinu je určena jeho strukturou. Přibližně 30 % proteinů je však takzvaně nestrukturovaných nebo strukturovaných jen částečně. Tyto „přirozeně nestrukturované proteiny“ (z angl. Intrinsically disordered proteins) byly biofyzikální komunitou dlouho přehlíženy. V současnosti se však zájem o jejich studium výrazně zvyšuje¹². Nestrukturované proteiny mohou přecházet mezi různými strukturními uspořádáními, což jim umožňuje rozeznávat s vysokou specifitou více různých interakčních partnerů. Tyto proteiny jsou často přítomné v jádře a účastní se regulace transkripce a buněčné signalizace. Pro studium struktury těchto proteinů se jen těžko uplatňuje rentgenová krystalografie, a proto se k jejich studiu využívá zejména metoda nukleární magnetické rezonance (NMR)^{13–15}. Metodám studia struktury proteinů se detailněji věnuje následující kapitola (kap. 1.2, str. 20).

Model, který říká, že struktura proteinu je určena jeho sekvencí a struktura pak předpovídá jeho funkci, byl vyvinut na základě studia enzymů. Tento model skutečně lze aplikovat na enzymy a transportní proteiny. Signalizační a regulační proteiny ale často využívají přirozeně nestrukturované řetězce. Mnoho strukturovaných signálních domén se váže na nestrukturované proteinové partnery a mnoho signálních enzymů (kinázy, acetylázy, methylázy) působí na nestrukturované úseky proteinů. Ve srovnání se strukturovanými proteiny mají ty nestrukturované při signalizaci zásadní výhodu, neboť lépe reagují na změny v okolním prostředí¹⁶.

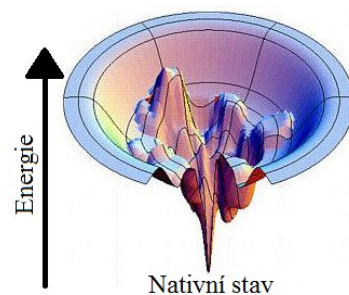
1.1.2 Skládání proteinů

Na začátku 60. let 20. století americký biochemik Christian Anfinsen studoval reverzibilní denaturaci enzymu ribonukleázy¹⁷. Na základě těchto a dalších experimentů vytvořil teorii, dnes známou jako Anfinsenovo dogma. To říká, že aminokyselinová sekvence (primární struktura proteinu) předurčuje rozložení proteinu v prostoru (jeho trojrozměrnou nativní strukturu)¹⁸.

V dalších letech se otázka skládání proteinů stala velice diskutovanou. První pracovní teorií byl „model dvou stavů proteinu“ – nativního a denaturovaného¹⁹, který sbalování proteinů vysvětluje jako skokový jev mezi dvěma formami, ve kterých se proteinový řetězec může nacházet. Tuto myšlenku však brzy vyvrátil takzvaný Levinthalův paradox, který v podstatě konstatuje fakt, že pokud by se protein správně složil pouze na základě zkoušení všech možných konformací vycházejících z aminokyselinové sekvence, trvalo by to mnohem déle než je průměrná délka jednoho lidského života²⁰. Začaly proto vznikat teorie, které navrhují, že existují cesty skládání proteinů a strukturní mezistavy (jakési kroky ve sbalování proteinu). Dlouhou dobu ale trvalo existenci těchto mezistavů dokázat experimentálně^{21,22}.

V dnešní době se problém skládání proteinů řeší jako komplexní děj. Mezi nejvýznamnější faktory vedoucí ke správnému sbalení proteinu patří hydrofobní efekt²³, van der Waalsovy interakce a vodíkové můstky²⁴. Většina proteinů se skládá do unikátních trojrozměrných struktur. Tvar, do kterého se protein přirozeně složí, je označován jako nativní stav. V tomto stavu protein zaujímá konformaci o nejnižší volné energii. Mnoho proteinů dokáže dosáhnout nativního stavu pouze na základě chemických vlastností jejich aminokyselin, ostatní ale ke sbalení potřebují asistenci ribozomu a dalších molekul přítomných při přirozené syntéze proteinů⁵.

Experimentálně bylo prokázáno, že některé malé proteiny se skládají přímo, bez mezistavů. Podle nové teorie tyto mezistavy mohou fungovat jako kinetické pasti, které účinnost skládání proteinů snižují. Ke grafickému znázornění této teorie se používá model nálevky (obr. 4), na jejíž vnitřních stěnách jsou mezistavy o různých konformačních energiích a



Obr. 4. Model nálevky. Převzato a upraveno dle¹³⁷.

v jejím nejnižším bodě je stav nativní. Mezi různými mezistavy se nacházejí energetické bariéry^{25,26}.

Významnou roli při skládání proteinů hrají ribozomy, které jsou tvořeny malou a velkou podjednotkou. Ve velké podjednotce se nachází tunel, kterým nově vznikající protein opouští ribozom²⁷. Vzniklý polypeptidový řetězec může být dále podroben enzymatickému zpracování, posttranslačním modifikacím, předán k asistovanému složení pomocí chaperonů (pomocných molekul), nebo přenesen k plasmatické membráně^{28,29}. V rostoucí buňce většina ribozomů syntetizuje peptidové řetězce rychlostí okolo 20 aminokyselin za sekundu u prokaryot a 5-9 aminokyselin za sekundu u eukaryot²⁷. Rychlost syntézy proteinů však závisí na dostupnosti různých transferových RNA, které během translace přinášejí jednotlivé aminokyseliny a na základě interakce kodon-antikodon je přiřazují do nově vznikajícího polypeptidového řetězce. Genetický kód je takzvaně degenerovaný, což znamená, že různé transferové RNA mohou nést stejné aminokyseliny a použití takovýchto synonymních kodonů může ovlivnit rychlost translace³⁰. Změna rychlosti syntézy proteinů pak může ovlivnit kinetiku sbalování proteinu, jeho nativní strukturu i fyziologickou funkci³¹⁻³³.

Ke správnému sbalení proteinů významně přispívají pomocné molekuly, tzv. chaperony³⁴. Tyto molekuly se vážou na hydrofobní oblasti proteinu, a brání tak jeho nesprávnému sbalení, případně usnadňují skládání proteinu do vyšších oligomerních stavů. Chaperony byly dříve označovány jako proteiny teplotního šoku (HSP, z angl. Heat-shock proteins) z důvodu jejich zvýšeného výskytu při teplotním stresu. Později bylo však prokázáno, že jsou v menší míře přítomné v buňce i za standardních podmínek³⁵.

1.1.3 Příprava rekombinantních proteinů

Izolací z přírodních zdrojů (zvířecí orgány, rostlinný materiál) lze mnohdy získat pouze malé množství proteinů, které pro strukturní studie není dostačující. Proto byly vyvinuty heterologní expresní systémy umožňující přípravu zkoumaného proteinu v dostatečném množství. Možnost poměrně jednoduché manipulace s DNA a tvorba rekombinantní DNA byla odstartována objevem restričních endonukleáz umožňujících vložení genu zájmu do expresního vektoru, kterým je nejčastěji plasmid. S využitím polymerázové řetězové reakce (PCR, z angl. Polymerase chain reaction) pro amplifikaci DNA a sekvenačních technik pro rychlé ověření sekvence připravené DNA je v současnosti možné připravit expresní vektor pro přípravu libovolného proteinu. Nejčastěji využívané

expresní systémy pro produkci rekombinantních proteinů pro strukturní analýzu jsou založeny na bakteriálním rodu *Escherichia coli* (*E. coli*)³⁶.

Kromě prokaryotických expresních systémů je také využíváno systémů eukaryotických, jejichž bezespornou výhodou je přítomnost většího množství specifických posttranslačních modifikací (kap. 1.1, str. 12), které často hrají významnou roli pro funkci proteinu pocházejícího původně z eukaryotického organismu. Tato výhoda je však převažována vysokou finanční i časovou náročností, a tyto expresní systémy jsou proto využívány jen v nezbytných případech. Jako eukaryotické expresní systémy jsou využívány například kvasinky, hmyzí buňky, rostlinné buňky nebo buňky savců³⁷.

Nejnovější variantou pro expresi rekombinantních proteinů je tzv. „cell-free“ exprese (nazývaná také syntéza proteinů *in vitro*). Při této metodě se využívá cytosolárního extraktu z různých organismů (zatím nejpoužívanější je extrakt z *E. coli* nebo z pšeničných klíčků). „Cell-free“ metody přináší oproti klasickým expresním systémům mnoho výhod. Jsou vhodné například pro přípravu toxinů a membránových proteinů, lze je využít pro studium funkce proteinu v závislosti na různých uměle vytvořených podmínkách. Další významnou výhodou těchto expresních systémů je možnost rychlého a ekonomického značení nově syntetizovaných proteinů, neboť reakce probíhá v relativně malých objemech. Zatím jsou však „cell-free“ metody finančně velmi nákladné a optimalizace produkčních podmínek velmi časově náročné³⁸.

V této práci bylo k produkci rekombinantního proteinu využito prokaryotického expresního systému bakteriálního kmene *E. coli* BL21 (DE3). Bakteriální kmen *E. coli* BL21 (DE3) nese ve svém genomu heterologní informaci pro syntézu vysoce aktivní T7 RNA polymerázy, která původně pochází z T7 bakteriofága a má vysokou specifitu ke svému T7 promotoru. Syntéza T7 polymerázy je řízena promotorem *lacUV5*, který je blokován *lac* represorem, k jehož vyvážení dochází v přítomnosti laktózy nebo jejího nehydrolyzovatelného analogu isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG), který je běžně využíván jako induktor exprese. Po indukci exprese dojde k syntéze T7 RNA polymerázy, která nasedá na T7 promotor, který se v expresním vektoru pET nachází těsně před genem kódujícím připravovaný protein. Indukce exprese prostřednictvím T7 polymerázy pak vede k nefyziologicky silné transkripci tohoto genu a vzniku mediátorové RNA kódující rekombinantní protein, která je následně ribozomy překládána do aminokyselinové sekvence.

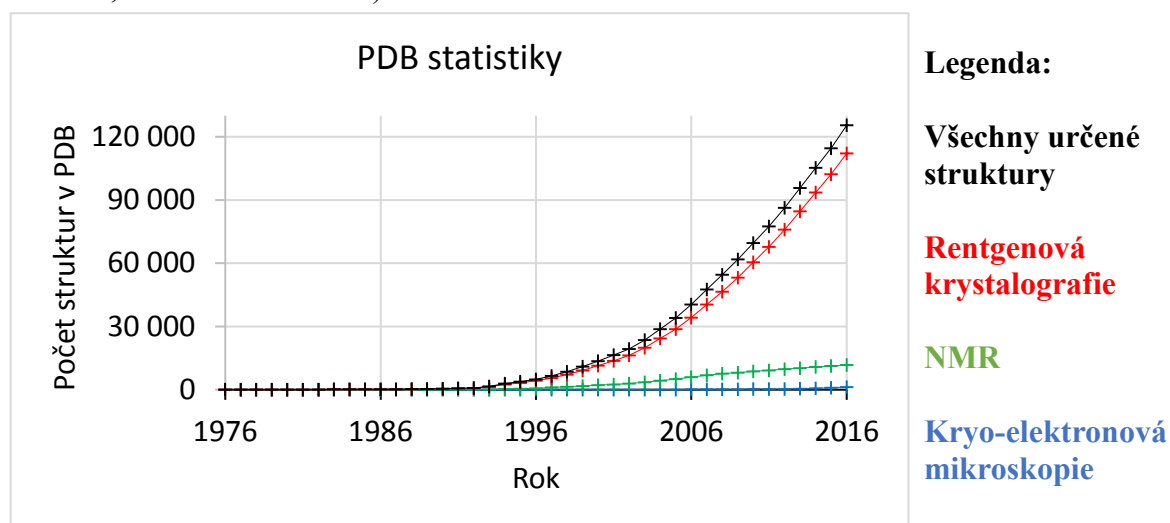
Obsah rekombinantního proteinu několik hodin po indukci exprese většinou tvoří minimálně 50 % všech proteinů přítomných v buňkách^{36,39,40}.

Využití prokaryotických expresních systému, které poskytují vysoký proteinový výtěžek, je však často provázeno tvorbou proteinových agregátů, známých jako inkluzní tělíska. Pokud chceme získat rekombinantní protein obsažený v inkluzních tělískách v nativním stavu, je potřeba tato tělíska izolovat, solubilizovat a reverzibilně denaturovaný protein následně renaturovat a purifikovat (obvykle pomocí chromatografických metod). Nejzásadnější kroky, při kterých také dochází k největším ztrátám proteinu, jsou solubilizace a renaturace. Solubilizace inkluzních tělísek se běžně provádí v roztoku obsahujícím vysoké koncentrace chaotropních činidel, která naruší nekovalentní interakce v molekule proteinu (používány jsou především guanidin nebo močovina). V případě proteinů obsahujících více cysteinů se také využívá redukčních činidel (β -merkapt ethanol nebo dithiothreitol) pro redukci disulfidických vazeb. Renaturace je prováděna odstraněním (resp. snížením celkové koncentrace) látek použitých k reverzibilní denaturaci proteinu a jeho současnému převedení do roztoku. Nejčastěji používaná renaturační metoda je zředění roztoku obsahujícího reverzibilně denaturovaný protein ve velkém objemu renaturačního pufru (obsahujícího nízkomolekulární látky fungující jako chemické chaperony a zároveň udržující osmotický tlak) a následná dialýza. Tyto postupy obvykle vyžadují časově náročné optimalizace pro zvýšení výtěžku proteinu v nativním stavu. Proces renaturace totiž probíhá současně s tvorbou nesprávně složených verzí rekombinantního proteinu, které mohou tvořit nejruznější agregáty^{41,42}.

1.2 Metody určování trojrozměrné struktury proteinů

Strukturní data, jako všechna biologická data, mohou být ovlivněna šumem a artefakty. Naše poznání makromolekulárních struktur je omezeno jejich flexibilitou, dynamikou a kvalitou měření. Ke studiu proteinů tedy potřebujeme velice citlivé metody, které nám mohou pomoci pochopit tyto zdánlivě neuspořádané procesy, a tím objasnit jejich význam pro funkci proteinu. Prozatím se tedy často musíme smířit pouze s kusými informacemi o struktuře⁴³.

Převážná část ($\approx 90\%$) dnes známých struktur proteinů byla získána pomocí difrakčních metod (zejména rentgenové krystalografie), další část tvoří struktury určené pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) ($\approx 10\%$) a kryo-elektronové mikroskopie (cryoEM) ($\approx 1\%$). Na obrázku 5 je znázorněn graf, který vyjadřuje nárůst počtu struktur zanesených v PDB databázi (z angl. Protein data bank), které byly získány pomocí těchto metod. K vytvoření modelu struktury je ale často zapotřebí dalších dílčích experimentů pro charakterizaci sporných regionů. K tomu jsou využívány metody, jako jsou například cirkulární dichroismus (CD), malouhlový rozptyl rentgenového záření, hmotnostní spektrometrie, hmotnostní spektrometrie v kombinaci s vodík-deuteriovou výměnou a další. Díky relativně velkému množství vyřešených proteinových struktur a výkonné výpočetní technice lze metodou známou jako homologní modelování předpovídat struktury proteinů podobných těm, jejichž struktury jsou již známy. Rozvíjí se také metody *ab initio*, které se snaží předpovídat trojrozměrnou strukturu proteinů z jejich primární struktury. Hranice mezi metodami *ab initio* a homologním modelováním jsou však neurčité, protože i v metodách *ab initio* je využíváno znalosti struktury všemožných sekvencí polypeptidů (př. software Rosseta, software PSIPRED)⁴⁴⁻⁴⁸.



Obr. 5. Množství struktur proteinů uložených v PDB databázi. Černá linka znázorňuje celkový počet struktur získaný všemi danými metodami. Červená vyjadřuje počet struktur získaných pomocí rentgenové krystalografie, zelená pomocí NMR a modrá pomocí kryo-elektronové mikroskopie. Vytvořeno dle⁴⁴.

1.2.1 Rentgenová krystalografie

Rentgenová krystalografie (X-ray krystalografie, angl. X-ray crystallography) je metoda, jejíž fyzikální podstatou je elastický rozptyl rentgenového záření na elektronových obalech atomů molekuly proteinu. Intenzita rozptýleného záření z jedné molekuly je však

příliš nízká, a proto je zapotřebí proteinového krystalu, který díky své geometrické uspořádanosti a periodicitě může zesilovat rozptýlené záření. Nalezení vhodných podmínek pro vznik dostatečně velkého a kvalitního krystalu je však často velkou překážkou⁴⁹.

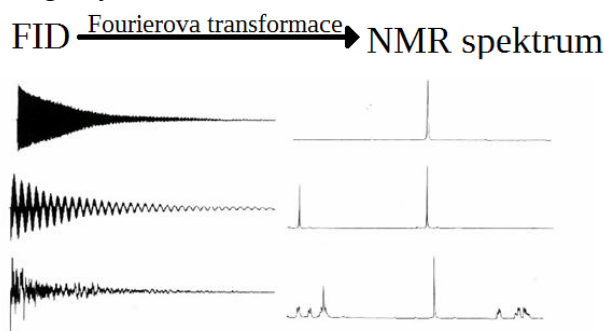
Výsledkem experimentu rentgenové krystalografie je takzvaný difrakční obrazec, ze kterého lze vypočítat amplitudy rozptýleného záření⁵⁰. Pro výpočet proteinové struktury však potřebujeme znát i jeho fázi, tomuto komplikovanému určení fáze rozptýleného záření se říká fázový problém. Fázový problém lze řešit různými metodami. V dnešní době je díky velkému množství známých proteinových struktur často možné využít k řešení fázového problému metodu označovanou jako molekulární nahrazení (z angl. *molecular replacement*), kdy je k určení fáze využito fáze podobné struktury. Pokud takový model není k dispozici, je třeba přistoupit k experimentálnímu řešení. Nejběžnější experimentální metodou k řešení fázového problému je metoda anomální difrakce při různých vlnových délkách rentgenového záření (MAD, z angl. *Multi-wavelength anomalous dispersion*). Při této metodě se používá synchrotron, který emituje rentgenové záření o různých vlnových délkách^{51,52}. Známe-li amplitudy a fáze rozptýleného záření, můžeme sestavit mapu elektronových hustot, do níž se následně umísťují jádra atomů a vytváří se první model proteinové struktury. Tento model je dále vylepšován kontrolou stericity (délek vazeb, vazebných úhlů a možností zaměnitelné konformace postranních řetězců) a pomocí výpočetních metod^{49,53,54}.

1.2.2 Kryo-elektronová mikroskopie

Jak již bylo uvedeno, nejběžnějšími metodami pro určování struktury proteinů na atomární úrovni jsou rentgenová krystalografie a NMR. V posledních letech ale díky technologickému pokroku těmto metodám začíná konkurovat tzv. kryo-elektronová mikroskopie (cryoEM, angl. *Cryo-electron microscopy*). CryoEM je druh transmisní elektronové mikroskopie (TEM), při které je velmi tenký (ideálně o tloušťce jedné molekuly) a hluboce zmražený vzorek prozařován svazkem elektronů. Ze získaných dat lze pomocí cryoEM tomografie (cryoET) vytvořit trojrozměrnou mapu pozorovaného proteinu, a s její pomocí pak vytvořit jeho strukturní model. Zajímavá je také možnost pozorování proteinových mikrokystalů (příliš malých pro X-ray experiment) pomocí cryoEM. Tato metoda se nazývá MicroED a poskytuje struktury s velmi vysokým rozlišením⁵⁵⁻⁶⁰.

1.2.3 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR) využívá magnetických vlastností jader atomů a jejich chování v magnetickém poli. Působením silného magnetického pole a díky jevu označovanému jako Zeemanův efekt dochází k rozdělení jader na stavy s různou energií⁶¹. Čím větší je síla použitého magnetického pole, tím větší jsou energetické rozdíly mezi těmito hladinami, a tím vyšší početní rozdíly v obsazení těchto hladin (stavy s nižší energií jsou více populované, toto je podstatou existence NMR signálu). Při NMR experimentu jsou jádra ozařována radiofrekvenčním zářením, které svou energií odpovídá jejich rezonančním frekvencím. Po vypnutí radiofrekvenčního záření dochází k relaxaci precesního pohybu jaderné magnetizace a záznamu volného doznívání indukce (FID, z angl. Free induction decay), které představuje surová NMR data. S využitím Fourierovy transformace lze FID rozložit na jednotlivé signály dle rezonančních frekvencí a sestavit NMR spektrum (obr. 6). V NMR spektrech jsou rezonanční frekvence vztaženy ke standardu a jsou uváděny jako bezrozměrná veličina označovaná jako chemický posun (δ , s jednotkami ppm). Chemické posuny jednotlivých atomových jader nesou informaci o jejich chemickém okolí, respektive o stínění vlastního magnetismu jejich elektronovými obaly⁶².



Obr. 6. Převod volného dohasínání indukce (FID) na NMR spektrum, k čemuž se využívá Fourierovy transformace. Převzato z¹³⁸.

Pomocí NMR lze dnes určovat polohu jader atomů v molekule proteinu, a stanovit tak jeho trojrozměrnou strukturu. Geometrická informace o struktuře může být získána z interakcí páru jader. Magnetické dipól-dipolové interakce, zprostředkované vzájemným ovlivňováním dvou magnetických dipólů v prostoru, umožňují určení vzdáleností. Zvláštním případem dipól-dipolových interakcí jsou J-interakce, zprostředkované vzájemným ovlivňováním dvou magnetických dipólů propojených chemickou vazbou (na této interakci se podílejí i valenční elektrony zprostředkovávající tuto vazbu), a které nesou informace o délkách vazeb a torzních vazebných úhlech⁶³. Díky technologickým pokrokům se NMR stalo druhou technikou (vedle X-ray krystalografie) pro určování struktury proteinů na atomární úrovni⁶⁴. K důležitým vylepšením patří vedle silnějších magnetických polí a

citlivějších detektorů využití izotopového obohacení vzorku (kap. 1.2.3.1, str. 24) umožňující měření nepřehledného množství vícedimenzionálních spekter s využitím nejrůznějších pulzních sekvencí. Ty jsou založeny na sofistikovaných přenosech magnetizace mezi různými typy jader za využití různých variabilních časových prodlev a specifických radiofrekvenčních pulzů. Výhodou NMR oproti X-ray krystalografii je skutečnost, že při této metodě je studována struktura proteinu v roztoku, tedy v podmínkách blízkých fyziologickým. Protože je vzorek v roztoku, lze sledovat navíc dynamiku proteinu (v řádu ps až dní), což může napomoci k pochopení jeho funkce⁶⁵⁻⁶⁷.

Metoda NMR má však i svoje nevýhody. Jedním z největších omezení NMR je limitovaná velikost zkoumaných makromolekul. Ve většině případů je pro proteiny větší než 30 kDa často možné navrhnout pouze přibližnou strukturu. Větší molekuly se totiž v roztoku nepohybují dostatečně rychle na to, aby došlo k úplnému zprůměrování anizotropních interakcí (dipól-dipólové interakce, anizotropie chemického posunu), a dochází tak k rozšíření signálů. Pokud je relaxace signálu rychlejší než potřebná časová prodleva v pulzní sekvenci, pak nelze daný experiment naměřit. Druhým důvodem, proč je obtížné získat NMR spektrum větších molekul, je fakt, že obsahují více atomových jader, a proto jsou spektra komplikovanější. Dalším běžným problémem při NMR experimentech je nedostatečná stabilita zkoumaného proteinu ve vzorku. Z důvodu nízké citlivosti dané metody je navíc nutné, aby byl protein v poměrně vysoké koncentraci, což jeho stabilitu může ještě snižovat^{64,67-69}.

1.2.3.1 NMR aktivní jádra a izotopové obohacení

Pouze některá atomová jádra jsou vhodná pro NMR experimenty. Důležitá je hodnota jejich magnetického momentu hybnosti neboli spinu. Jádra, která mají lichý počet protonů a/nebo neutronů, mají nenulový spin a mohou poskytovat NMR signál⁷⁰.

Pro řešení struktury makromolekul se pro NMR experimenty využívají jádra se spinem $\frac{1}{2}$. Výhodou takových jader je, že se vlivem vnějšího magnetického pole rozdělí jen na dvě energetické hladiny (také označované jako nízko- a vysokospinový stav). Jádra se spinem vyšším než $\frac{1}{2}$ poskytují díky kvadrupolárním interakcím velice široké spektrální čáry a získaná spektra by bylo prakticky nemožné vyhodnotit. V přírodě nejběžnější atom se spinem $\frac{1}{2}$ je vodík ^1H neboli proton, který je nejvíce zastoupeným izotopem vodíku na Zemi (99,98 %). Vyznačuje se vysokou citlivostí, ale malým rozptylem chemických posunů (≈ 15 ppm)⁷⁰.

Dalším využívaným atomem se spinem $\frac{1}{2}$ je dusík ^{15}N . Jeho přirozené zastoupení v přírodě je však velmi nízké (0,37 % atomů dusíku), vůči protonům má mnohem nižší citlivost a rozptyl chemických posunů je pouze okolo 30 ppm. Třetím nejčastěji používaným jádrem se spinem $\frac{1}{2}$ je uhlík ^{13}C . Ten se vyznačuje vysokým rozptylem chemických posunů (≈ 210 ppm), vyšší citlivostí než ^{15}N (ale stále mnohonásobně nižší než u protonu) a jeho přirozené zastoupení v přírodě je pouze 1,11 % atomů uhlíku⁷⁰.

Nízké přirozené zastoupení izotopů ^{13}C a ^{15}N lze obejít při rekombinantní expresi proteinů v médiu obsahujícím potřebné zdroje uhlíku a dusíku pro jejich syntézu skládající se pouze z těchto izotopů. Protein obsahující jádra ^{13}C a ^{15}N umožňuje aplikovat různé pulzní sekvence k cílenému přenosu magnetizace v molekule, a tím naměřit všemožná vícedimenzionální homo- a heteronukleární NMR spektra. Homonukleární spektra zprostředkovávají informace o korelacích mezi jádry stejného druhu, zatímco v heteronukleárních spektrech korelují signály různých druhů jader. Příkladem dvoudimenzionálního homonukleárního experimentu je 2D- ^1H , ^1H -NOESY a příkladem třídimenzionálního heteronukleárního experimentu, který využívá vodíková, dusíková i uhlíková jádra, je 3D- ^1H , ^{15}N , ^{13}C -HNCA^{65,71,72}.

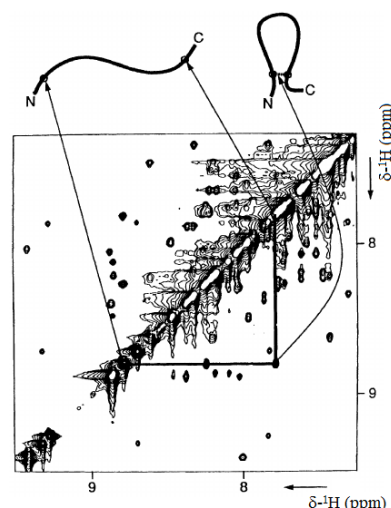
Z finančních důvodů méně využívaným, ale významným jádrem je také deuterium ^2H s hodnotou spinu 1. Jeho přirozené zastoupení v přírodě je 0,015 % vodíkových jader. Deuteraci lze využít ke zlepšení rozlišení i citlivosti spekter při charakterizaci větších proteinů (>20 kDa) nebo k potlačení signálů pocházejících z molekul vzorkového pufru^{70,73}.

1.2.3.2 Vzorek pro NMR experimenty

Vzorek proteinu pro NMR experimenty musí splňovat určité podmínky. Například platí pravidlo, že čím vyšší je koncentrace proteinu ve vzorku, tím rychleji lze naměřit NMR data, protein však nesmí tvořit agregáty. Nejnižší použitelná koncentrace proteinu je 0,2 mM a při využití klasických NMR zkumavek je zapotřebí 0,5 ml takového vzorku. Vzorek také musí zůstat stabilní po dobu sběru NMR dat (řádově týdny). Pokud je stabilita vzorku limitujícím faktorem, lze pro jednotlivé experimenty připravit vždy nový vzorek. To je však nevýhodné časově i finančně, a navíc mohou u různých vzorků být malé rozdíly v chemických posunech jader (rozdíly ve složení pufru, koncentrace proteinu atp.), což následně komplikuje přiřazování jednotlivých signálů. Je proto vhodné naměřit všechna data v jednom vzorku⁶⁷.

1.2.3.3 Zpracování experimentálních dat

V získaných spektrech je nejprve třeba najít a označit všechny signály a přiřadit je k atomům proteinu. Pro určení trojrozměrné struktury je důležitý nukleární Overhauserův efekt (NOE), ten je využíván u NOESY experimentů poskytujících informaci o vzdálenosti dvojic protonů díky dipolární interakci (v prostoru)⁷⁴, nacházejí-li se do 5 Å od sebe (obr. 7). Vzdálenost těchto protonů lze odhadnout na základě intenzity signálu, která je nepřímo úměrná šesté mocnině jejich vzdálenosti. Proteiny větší než 10 kDa vyžadují dvojitě izotopové značení ke zlepšení rozlišení signálů. Aby bylo možné určit, o které dva protony se jedná, je třeba nejprve na základě J-interakcí (přes chemickou vazbu) a známé primární struktury proteinu přiřadit rezonanční frekvence atomům peptidové páteře a na ní navázaných aminokyselinových zbytků (spektra HSQC, HNCA a další)⁷⁵. 2D-¹H,¹⁵N-HSQC spektrum nese informaci o všech korelacích mezi atomem vodíku a dusíku ve studované molekule, a tedy i o amidických skupinách peptidové páteře proteinu. Při přiřazování rezonančních frekvencí uhlíkovým atomům peptidové páteře a aminokyselinových zbytků si lze HSQC experiment představit jako průmět 3D ¹H,¹⁵N,¹³C experimentů do roviny ¹H,¹⁵N. Po přiřazení rezonančních frekvencí všem atomům a výpočtu jejich vzájemných prostorových souřadnic je možné přistoupit k výpočtům modelu struktury^{67,69,76,77}.



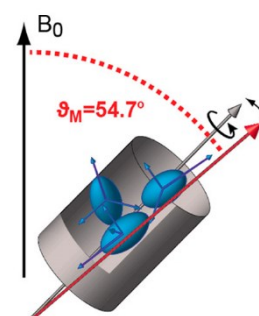
Obr. 7. 2D-¹H,¹H-NOESY spektrum. Výskyt signálu mimo diagonálu značí přítomnost dipolární interakce mezi dvěma vodíkovými jádry, která jsou od sebe vzdálena v prostoru maximálně 5 Å. Převzato z¹³⁹.

1.2.3.4 NMR v pevné fázi

NMR v pevné fázi (angl. solid-state NMR) je v současnosti rychle se rozvíjející odvětví NMR spektroskopie, s jehož pomocí lze řešit proteinovou strukturu. Jak již název napovídá, studovaný vzorek je v pevné fázi, a nedochází tedy k nahodilému pohybu molekul, který při pokusech v roztoku umožňuje zprůměrování anizotropních interakcí. Při experimentech v pevné fázi je tedy třeba dosáhnout zprůměrování anizotropních interakcí jiným způsobem⁷⁸. Výhodou NMR v pevné fázi však je, že zprůměrování anizotropních interakcí není závislé na velikosti studované molekuly. Za cenu komplikovanějších spekter lze tak řešit struktury větších proteinů, než umožňuje klasické NMR⁷⁹.

Bylo zjištěno, že rotací vzorku kolem vlastní osy v různých úhlech vůči směru vnějšího magnetického pole dochází ke zužování spektrální šířky signálu neboli k jeho zaostření. K nejvýraznějšímu zúžení signálu dochází při rotaci pod takzvaným magickým úhlem ($54,74^\circ$, obr. 8). Lepší rozlišení napomáhá přiřazení rezonančních frekvencí jednotlivým atomům, což je (stejně jako u NMR v roztoku) první krok při určování struktury z naměřených spekter⁷⁸.

Vzhledem k silným dipolárním interakcím mezi vodíkovými atomy, které způsobují rozšíření signálu, jsou pro získání strukturální informace využívána především uhlíková jádra ^{13}C , která vykazují větší rozmezí chemických posunů a nižší citlivost. Nicméně s využitím deuterace se při řešení spekter uplatňují i spektra vodíková. Při určování struktury v pevné fázi je tedy, stejně jako při klasických experimentech, nezbytné izotopové obohacení vzorku. Vzorek pro NMR v pevné fázi je většinou ve formě jemného prášku, ať už amorfního či krystalického původu. Membránové proteiny lze měřit i v jejich přirozeném prostředí – ve fosfolipidové dvojvrstvě^{80–84}.



Obr. 8. Rotace vzorku pod magickým úhlem. B_0 značí směr vnějšího magnetického pole. Převzato z¹⁴⁰.

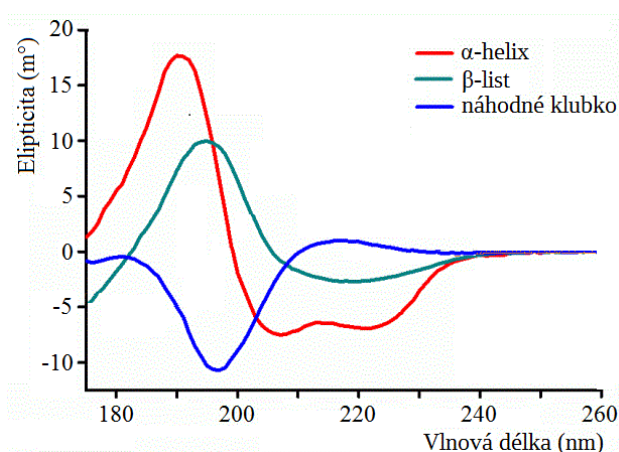
1.2.4 Dynamický rozptyl světla

Metoda označovaná jako dynamický rozptyl světla (DLS, z angl. Dynamic light scattering) je založena na analýze záření rozptýleného malými částicemi v roztoku nebo suspenzi. Jako světelný zdroj jsou využívány lasery, tedy zdroje monochromatického koherentního záření. Přesněji se jedná o analýzu fluktuací intenzity Rayleighova rozptylu v čase. K těmto fluktuacím dochází v důsledku Brownova pohybu částic ve vzorku, respektive díky změnám v jejich vzájemných vzdálenostech. Z fluktuací intenzity rozptýleného záření lze pak (pomocí autokorelační funkce druhého řádu) vypočítat distribuci

difúzních koeficientů. Větší molekuly difundují pomaleji, a lze tedy určit i distribuci velikostí částic ve vzorku. Při studiu proteinových vzorků se DLS využívá především ke kontrole, zda nedochází k agregaci proteinu a zda je vzorek monodisperzní (tzn. neobsahuje další proteiny). Dále lze DLS využít k určení velikosti proteinů (jejich hydrodynamického poloměru), případně ke sledování tvorby proteinových komplexů^{85,86}.

1.2.5 Cirkulární dichroismus

Metoda cirkulárního dichroismu (CD) je druh absorpční spektroskopie, která měří rozdíl v absorpci levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla neboli elipticitu. Aby mohl být CD signál detekován, molekuly měřeného vzorku musí být asymetrické (chirální), díky čemuž mají přechodný dipólový moment, a mohou tak absorbovat kruhově polarizované světlo o různých vlnových délkách. Jelikož peptidová vazba asymetrická je, lze metodu CD využít při charakterizaci sekundární struktury proteinů a jejích změn při vazbě ligandu nebo v závislosti na fyzikálně-chemických podmínkách. Určování zastoupení sekundárních struktur v proteinu se provádí analýzou naměřeného CD spektra pomocí algoritmů, které ho porovnávají se vzorovými spektry pro jednotlivé komponenty proteinové sekundární struktury (obr. 9). Například pro spektrum α -helixu jsou charakteristická dvě minima při 222 a 208 nm a maximum při 193 nm, zatímco absorpční spektrum pro β -skládaný list vykazuje minimum při 218 nm a maximum při 195 nm. Absorpční spektrum náhodného klubka má naopak při 195 nm minimum a nad 210 nm vykazuje velmi nízkou hodnotu elipticity⁸⁷.



Obr. 9. Standardy CD spekter pro α -helix, β skládaný list a náhodné klubko. Převzato a upraveno dle¹⁴¹.

1.3 mNkr-p1b a jeho role v organizmu

Tato kapitola se detailněji zabývá proteinem Nkr-p1b, který byl v rámci diplomové práce studován. Věnuje se lokalizaci tohoto myšího receptoru v organizmu, jeho zařazení dle strukturní podobnosti, vysvětluje jeho funkci a význam.

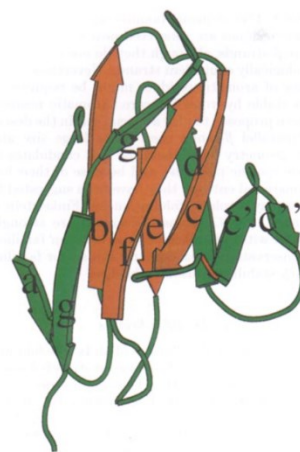
1.3.1 NK buňky a jejich receptory

Myší receptor Nkr-p1b se nachází na membránách tzv. „přirozeně zabíječských buněk“ (NK, z angl. Natural killer). NK buňky jsou lymfocyty podílející se na nespecifické imunitní odpovědi a zároveň kooperují se složkami specifické imunity. Stejně jako cytotoxické T-lymfocyty i NK buňky vykazují cytolytickou aktivitu, ale na rozdíl od T-lymfocytů, které podléhají komplikované reakční kaskádě vedoucí ke specifické imunitní odpovědi, dochází k aktivaci NK buněk pouze na základě receptorové interakce⁸⁸.

NK buněčné receptory se na základě strukturní podobnosti dělí do dvou skupin. Rozlišujeme NK receptory imunoglobulinové a C-lektinové. Obě tyto skupiny receptorů mají jak stimulační, tak inhibiční účinek. Rovnováha mezi těmito signály rozhoduje o aktivaci nebo inhibici cytotoxické dráhy^{88,89}. V případě stimulačních receptorů dochází při navázání odpovídajícího ligandu k přenosu signálu do buňky přes aktivační motiv (umístěný v transmembránové části receptoru) a na něj nasedající adaptorové molekuly, které aktivují signalizační kinázové kaskády. Inhibiční receptory nesou ve své cytoplasmatické části inhibiční motiv, který je po vazbě ligandu fosforylován, což umožňuje vazbu a aktivaci fosfatáz, které následně defosforylují substráty kináz účastníci se aktivační signalizace^{90,91}.

1.3.1.1 Imunoglobuliny

Imunoglobulinová doména se svou charakteristickou „sendvičovou“ strukturou antiparalelních β -skládáních listů (obr. 10) je hojně se vyskytující strukturní motiv nacházející využití v mnoha proteinech zajišťujících různorodé biologické funkce. Skupina imunoglobulinových receptorů nacházejících se na NK buňkách patří mezi transmembránové proteiny I typu (N-konec se nachází v cytosolárním prostoru),

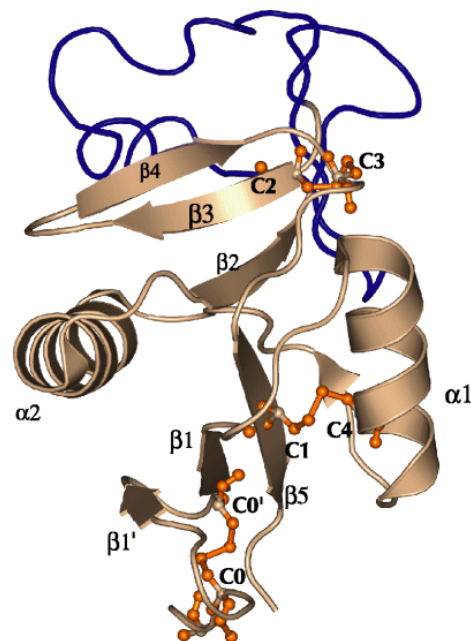


Obr. 10. Obecná imunoglobulinová doména. Oranžově vyznačená část antiparalelních β -skládáních listů je konzervovanější, zelené úseky jsou naopak variabilnější. Převzato z⁹².

kteře jedenkrát procházejí membránou a ve své extracelulární části nesou dvě až čtyři imunoglobulinové domény. Do této skupiny patří rodiny receptorů KIR a LIR (LILR)^{92–95}.

1.3.1.2 C-lectiny

Lektiny byly původně definovány jako proteiny nebo glykoproteiny vázající sacharidy⁹⁶. Postupem času se však ukázalo, že některé proteiny strukturně podobné lektinům vážou vedle sacharidů i jiné molekuly. C-lectiny jsou jednou z podskupin lektinů a přídomek „C“ jim byl udělen proto, že pro svou aktivitu vyžadují přítomnost vápenatých kationtů^{97,98}. Tato podskupina lektinů obsahuje doménu s unikátním uspořádáním sekundárních struktur označovanou jako CTLD doména (z angl. C-type lectin-like domain). Obecná struktura CTLD domény (obr. 11) je tvořena dvěma α -helixy, dvěma antiparalelními β -listy, smyčkou a je stabilizována dvěma až třemi disulfidickými můstky v rámci molekuly⁹⁹.



Obr. 11. Obecná struktura CTLD domény. Hnědou barvou jsou znázorněny: α -helixy a β -listy, modře: smyčka a oranžově: disulfidické můstky. Převzato z⁹⁹.

Valná většina proteinů nesoucích CTLD doménu je u živočichů extracelulární. Tato doména byla evolučně velmi oblíbená při vytváření nových funkcí a je zmiňována ve všemožných strukturních a funkčních souvislostech. Jak název napovídá, proteiny obsahující CTLD doménu vážou sacharidy (v různých strukturních kontextech) a tato vazba je závislá na přítomnosti vápenatých kationtů. Ukázalo se však, že některé proteiny nesoucí tuto doménu vážou místo sacharidů i proteiny, lipidy nebo anorganické sloučeniny^{100–103}. V některých případech může být CTLD také vícevazebnou doménou, která může specificky vázat například protein a sacharid^{104,105}.

Velmi zajímavou a v posledních letech často zmiňovanou skupinou jsou proteiny nesoucí CTLD doménu, které se nacházejí v parazitických bakteriích a virech a účastní se kontaktu s hostitelskou buňkou. Tyto proteiny mohou pocházet přímo z hostitele nebo se jedná o jejich napodobeniny^{99,106,107}.

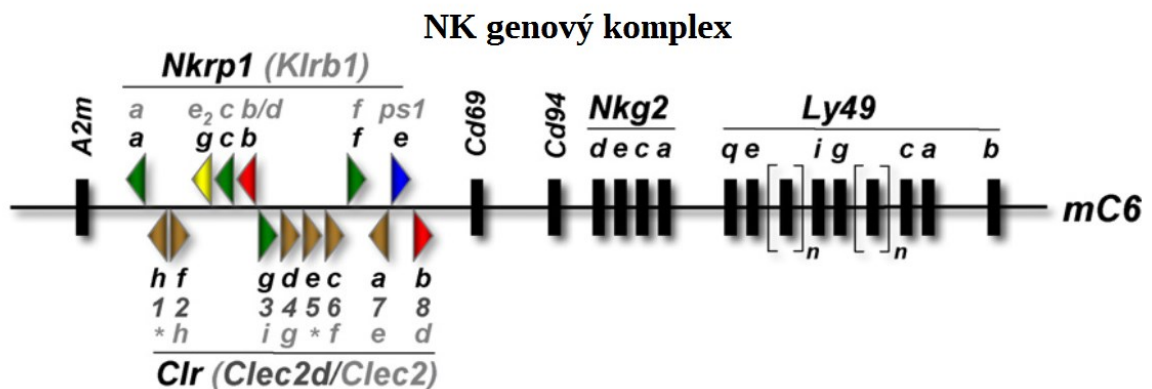
Zjištění, že některé proteiny s touto strukturou zcela nebo částečně ztratili schopnost rozpoznávat sacharidy, vedlo k zavedení označení CTLD, tedy „doména podobná lektinům

typu C^{99,106,107}. Mezi proteiny nesoucí CTLD doménu s omezenou schopností vázat sacharidy patří i NK buněčné receptory podobající se C-lektinům označované jako KLR (z angl. Killer cell lectin-like receptors). Jsou to transmembránové receptory II typu (N-konec lokalizován v cytoplasmě) jedenkrát procházející skrz membránu a obsahující jednu CTLD doménu. Patří mezi ně rodiny receptorů Ly49, CD94/NKG2 a již zmiňovaná Nkr-p1 (Klrb1)^{99,107}.

1.3.2 Rodina Nkr-p1 receptorů

Většina receptorů KLR váže glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. Major histocompatibility complex) I třídy a jim podobné proteiny. Rodina Nkr-p1 receptorů (z angl. Nature killer receptor protein, také označovaných jako Klrb1, z angl. Killer cell lectin-like receptor subfamily B) ale tyto proteiny nerozpoznává¹⁰⁷. Namísto toho Nkr-p1 receptory vážou jiné specifické proteiny nesoucí CTLD, některé z nich jsou označovány jako Clr (z angl. C-type lectin related) nebo také jako Clec2/OCIL a jsou umístěné v identickém genovém úseku jako Nkr-p1^{108,109}.

V myším genomu bylo doposud identifikováno sedm členů rodiny Nkr-p1 (*Nkrp1x*; $x = a, b/d, c, e, f, g$) (obr. 12), u potkanů jsou identifikovány čtyři receptory NKR-P1X ($X = A, B, F, G$) a u člověka pouze jeden NKR-P1A (CD161). Obdobnou ligandovou specifitu lze však pozorovat také u lidských receptorů Nkp65 a Nkp80 a některé zdroje tyto dva receptory řadí do NKR-P1 rodiny receptorů^{107,110–112}.



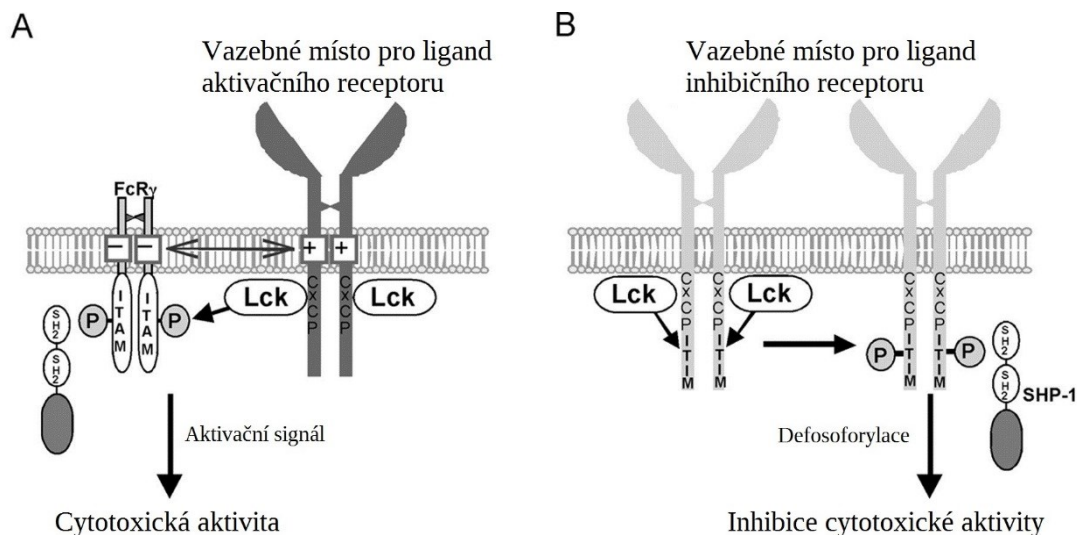
Obr. 12. Rozložení genů pro KLR na šestém chromozomu u myši. Zeleně jsou označeny aktivační receptory a jejich ligand, červeně inhibiční receptor a ligand, žlutě a hnědě receptory s neurčitou funkcí a modře pseudogen. Převzato a upraveno dle¹¹⁰.

Myší proteiny Nkr-p1a a Nkr-p1c mají aktivační funkci, Nkr-p1b a Nkr-p1d jsou alelické izoformy a plní funkci inhibiční. Gen *nkrp1e* obsahuje stop-kodon, jedná se tedy

o pseudogen (nedochází k transkripci do mediátorové RNA). K expresi receptoru Nkr-p1f dochází, jeho funkce je však rozporuplná. V případě receptoru Nkr-p1g není prokázáno, jestli dochází k jeho translaci do funkční proteinové struktury^{110,113–115}.

1.3.3 Nkr-p1b

Předkládaná diplomová práce se zabývá určením struktury ligand vazebné domény myšího receptoru Nkr-p1b. Jak bylo uvedeno výše, tento receptor patří do rodiny Nkr-p1, která patří do skupiny KLR, která se řadí do rodiny proteinů nesoucích CTLD doménu, které spadají do superrodiny C-lektinů. Nkr-p1b nese ve své cytoplasmatické části (stejně jako aktivační receptory) motiv CxCP, který je zodpovědný za asociaci s Lck (z angl. *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) a který je esenciální při zahájení přenosu signálu Nkr-p1 receptory. Dalším důležitým motivem nacházejícím se v cytoplasmatické části Nkr-p1b je imunoreceptorový inhibiční motiv založený na tyrosinu (ITIM, z angl. *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*). Asociace motivu ITIM s SHP-1 fosfatázou (z angl. *Sarcoma homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*) vede k defosforylaci, a tím inhibici kináz přenášejících aktivační signál k zahájení cytotoxické aktivity NK buněk. Nkr-p1b na rozdíl od aktivačních KLR postrádá argininový zbytek na rozhraní transmembránového a extracelulárního úseku, který je zodpovědný za asociaci s receptorem FcR γ nesoucím aktivační motiv ITAM (z angl. *Immunoreceptor*



Obr. 13. Schématický náčrt přenosu signálu z Nkr-p1 receptorů do buňky. A: aktivační receptor, B: inhibiční receptor. Vysvětlivky: CxCP-motiv obsahující dva cysteiny a prolin, FcR membránový protein asociovaný s ITAM motivem, ITAM-imunoreceptorový aktivační motiv založený na tyrosinu, ITIM-imunoreceptorový inhibiční motiv založený na tyrosinu, Lck-tyrosin kináza specifická pro lymfocyty, SH2-Sarcoma homologní doména rozeznávající fosforylované tyrosinové zbytky na jiných proteinech, SHP-1- Sarkom homologní doména asociovaná s tyrosin fosfatázou. Převzato a upraveno dle¹¹⁷.

tyrosine-based activation motif). Na obrázku 13 (str. 32) je schematicky znázorněn přenos signálu z Nkr-p1 receptorů do buňky. V extracelulární části se nachází „krček“ propojující transmembránovou doménu s CTLD (kap. 1.3.1.2, str. 30), která obsahuje tři disulfidové můstky C94-C105, C122-C210, C189-C202¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Vazebným partnerem receptoru Nkr-p1b je transmembránový protein Clr-b, který je exprimován na povrchu většiny krevních buněk (kromě červených krvinek a krevních destiček), a vyskytuje se tedy prakticky ve všech tělesných tkáních (kromě mozku). Při některých virových onemocněních dochází ke snížení exprese proteinu Clr-b na povrchu napadené buňky. Při kontaktu takové buňky s NK buňkou pak převládou aktivační signály, dojde ke spuštění cytotoxické aktivity a usmrcení patogenní buňky. Obdobný mechanismus se uplatňuje při kontaktu jiných imunitních receptorů s MHC glykoproteiny I třídy nebo jim podobných molekul. Stejně jako v tomto případě, i v případě interakce Nkr-p1b/Clr-b se však objevily patogeny schopné tento mechanismus obejít. Příkladem je potkaní cytomegalovirus (RCMV, z angl. Rat cytomegalovirus). RCMV ve svém genomu nese informaci pro protein nesoucí CTLD označovaný jako RCTL (z angl. RCMV C-type lectin-like), který je imitací Clr-b. RCTL je produkován na povrchu napadené buňky, a chrání ji tak před rozpoznáním pomocí Nkr-p1b/Clr-b systému^{109,119-122}.

V letošním roce byla publikována studie¹²³, která se zabývá obdobným mechanismem, jaký využívá RCMV, studuje však myší cytomegalovirus (MCMV, z angl. Murine cytomegalovirus). V rámci této studie byla pomocí rentgenové krystalografie určena struktura proteinu mNkr-p1b vázaného k proteinu m12, který na buňkách napadených MCMV funkčně imituje receptor Clr-b. Zajímavé je, že protein m12 na rozdíl od Clr-b a RCTL nemá CTLD doménu, ale doménu imunoglobulinovou¹²³. Tím vzniká otázka, zda je Clr-b jediným fyziologickým ligandem receptoru Nkr-p1b.

2 Cíle práce

Cílem předkládané diplomové práce byla v první řadě optimalizace produkce ligand vazebné domény myšního receptoru Nkr-p1b (mNkr-p1b LBD) v M9 minimálním médiu. Dále bylo nezbytné optimalizovat podmínky jeho renaturace a purifikace pro získání proteinového vzorku dostačující koncentrace a stability, jaké jsou vyžadovány pro strukturní analýzu pomocí nukleární magnetické rezonance. Cíle této práce lze shrnout v následujících bodech:

- optimalizace produkce mNkr-p1b LBD v M9 minimálním médiu
- produkce neznačené, jednou značené [^{15}N] a dvakrát značené [$^{13}\text{C},^{15}\text{N}$] formy proteinu mNkr-p1b LBD
- ověření monodisperzity vzorku proteinu pomocí DLS
- predikce zastoupení sekundárních struktur proteinu pomocí CD
- naměření NMR spekter pro strukturní analýzu
- vyhodnocení NMR spekter (přiřazení rezonančních frekvencí atomům proteinové páteře a jejich využití k určení zastoupení sekundárních struktur)
- vytvoření předběžného modelu 3D struktury proteinu mNkr-p1b LBD

3 Materiál

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy AL54	Mettler Toledo, <i>ČR</i>
Automatické pipety	Gilson, <i>USA</i>
Avance III (NMR spektrometr)	Bruker, <i>Německo</i>
Centrifuga Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, <i>USA</i>
Centrifuga Z 233 MK-2	Hermle, <i>Německo</i>
Centrifugační koncentrátor Amicon Ultra NMWL 10 kDa	Millipore, <i>USA</i>
Dialyzační trubice	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
HPLC systém NGC Quest™ 10	Bio-Rad, <i>Německo</i>
Chirascan™-plus (CD spektrometr)	Applied Photophysics, <i>UK</i>
Injekční filtr (0,22 µm)	TPP, <i>Švýcarsko</i>
Kolona ENrich SEC 70 (10×300)	Bio-Rad, <i>Německo</i>
Kolona Superdex 75 HR (10/300)	GE healthcare, <i>UK</i>
Magnetická míchačka CB-161	Stuart, <i>UK</i>
Mikrostříkačka (1000 µl)	GE healthcare, <i>UK</i>
Mikrozkumavky (1,5 ml)	Trefflab, <i>Švýcarsko</i>
Mrazicí box (-80 °C)	Forma Scientific, <i>USA</i>
Orbitální inkubátor	Gallenkamp Ltd., <i>UK</i>
pH metr Φ200	Beckman Coulter, <i>USA</i>
Předvážky HF-1200G	A & D Company, <i>Japonsko</i>
Souprava pro SDS elektroforézu	Bio-Rad, <i>Německo</i>
Souprava pro ultrafiltraci	Millipore, <i>USA</i>
Spektrofotometr DS-11	Denovix, <i>USA</i>
Ultrafiltrační membrána Ultracel NMWL 10 kDa	Millipore, <i>USA</i>
Ultrazvuková lázeň	KRAINTEK, <i>Slovensko</i>
Ultrazvuková sonda 4710	Cole-Parmer, <i>USA</i>
Vortexový míchač VELP	Scientifica, <i>Itálie</i>
Zdroj deionizované vody MilliQ	Millipore, <i>USA</i>
Zdroj napětí MP 250 V	Major Science, <i>USA</i>
Zetasizer Nano ZS90	Malvern, <i>UK</i>

3.2 Chemikálie

2-merkптоethanol	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Agaróza	Serva, <i>Německo</i>
Akrylamid	Serva, <i>Německo</i>
Azid sodný (NaN ₃)	Serva, <i>Německo</i>
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250)	Serva, <i>Německo</i>
Cystamin dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Cysteamin hydrochlorid	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
D-Glukóza	Lachema, <i>ČR</i>
D-Glukóza ¹³ C	Cambridge Isotope Laboratories, <i>UK</i>
DNáza I	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Lachema, <i>ČR</i>
Dodecylsíran sodný (SDS)	Serva, <i>Německo</i>
Dusičnan stříbrný (AgNO ₃)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Formaldehyd (H ₂ CO)	Lachema, <i>ČR</i>
Glycerol	Lachema, <i>ČR</i>
Glycin	Serva, <i>Německo</i>
Guanidin hydrochlorid	Serva, <i>Německo</i>
HEPES	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Hydrogenfosforečnan sodný (Na ₂ HPO ₄)	Lachema, <i>ČR</i>
Hydroxid sodný (NaOH)	Lachema, <i>ČR</i>
Chlorid amonný (NH ₄ Cl)	Lachema, <i>ČR</i>
Chlorid amonný (NH ₄ Cl) ¹⁵ N	Cambridge Isotope Laboratories, <i>UK</i>
Chlorid hořečnatý (MgCl ₂)	Lachema, <i>ČR</i>
Chlorid sodný (NaCl)	Lachema, <i>ČR</i>
Chlorid vápenatý (CaCl ₂)	Lachema, <i>ČR</i>
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>

Kanamycin	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Kvasničný extrakt	Biolife, <i>Itálie</i>
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Kyselina octová (CH ₃ COOH)	Lachema, <i>ČR</i>
L-Arginin hydrochlorid	Serva, <i>Německo</i>
Leupeptin	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Lysozym	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
N,N-methylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, <i>Německo</i>
Marker proteinových standardů pro SDS elektroforézu	Thermo Scientific, <i>USA</i>
Methanol	Lachema, <i>ČR</i>
Peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
RNáza I	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Sacharóza	Lachema, <i>ČR</i>
Síran hořečnatý (MgSO ₄)	Lachema, <i>ČR</i>
Tetracyklin	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Thiamin hydrochlorid	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Thiosíran sodný (Na ₂ S ₂ O ₃)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Serva, <i>Německo</i>
Triton X-100	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Trypton	Oxoid, <i>USA</i>
Uhličitan draselný (K ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>

3.3 Roztoky a pufrы

- 30% (w/w) zásobní roztok akrylamidu: 29% (w/w) akrylamid, 1% (w/w) N,N'-methylen-bis-akrylamid
- Barvicí roztok na polyakrylamidový gel: 0,25 % (w/w) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová
- Dialyzační pufr: 15mM TRIS, 50mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 8,5
- DNáza I: zásobní roztok 100 U/μl, pracovní koncentrace 10 U/ml
- Elektrodotový pufr pro SDS elektroforézu: 25mM TRIS, 250mM glycin, 0,1% (w/w) SDS, 0,2mM NaN₃, pH 8,3
- Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF): zásobní roztok 100mM (v ethanolu), pracovní koncentrace 1mM

- Guanidinový pufr: 6M guanidin, 50mM TRIS, 10mM DTT, pH 8,0
- Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG): zásobní roztok 1M, optimalizovaná pracovní koncentrace 0,4mM
- Kanamycin: zásobní roztok 50 mg/ml, pracovní koncentrace 50 μ g/ml
- Leupeptin: zásobní roztok 100mM, pracovní koncentrace 10 μ M
- Neredukující vzorkový pufr (2 \times koncentrovaný): 100mM TRIS; 4% (w/w) SDS; 0,2% (w/w) bromfenolová modř, 20% (v/v) glycerol, pH 6,8
- Odbarvovací roztok na polyakrylamidový gel: 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová
- Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek: 50mM TRIS, 100mM NaCl, 1mM 2-merkptoethanol, 1mM NaN₃, pH 7,4
- Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek s detergentem: 0,5% (w/w) Triton X-100, 50mM TRIS, 100mM NaCl, 1mM NaN₃, 1mM 2-merkptoethanol, pH 7,4
- Pufr pro gelovou filtraci HEPES: 10mM HEPES, 50mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 7,5
- Pufr pro gelovou filtraci PBS: 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 2,7mM KCl, 50mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 7,5
- Pufr pro gelovou filtraci PIPES: 15mM PIPES, 50mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 7,0
- Redukující vzorkový pufr pro SDS elektroforézu (2 \times koncentrovaný): 100mM TRIS, 4% (w/w) SDS, 0,2% (w/w) bromfenolová modř, 20% (v/v) glycerol a 200mM dithiotreitol; pH 6,8
- Renaturační pufr: 1M L-arginin, 50mM TRIS, 100mM CaCl₂, 1mM NaN₃, 9mM cysteamin, 3mM cystamin, pH 8,5
- RNáza I: zásobní roztok 10 mg/ml, pracovní koncentrace 2,5 μ g/ml
- Rozdělovací polyakrylamidový gel pro SDS elektroforézu (15% (w/w)), V = 20 ml: 4,6 ml destilovaná voda; 10 ml 30% (w/w) akrylamid; 5 ml 1,5M TRIS pufr pH 8,8; 200 μ l 10% (w/w) SDS; 8 μ l TEMED a 200 μ l 10% (w/w) APS
- Sacharózový lyzační pufr: 25% (w/w) sacharóza; 50mM TRIS; 1mM kyselina ethylendiamintetraoctová; 1mM NaN₃; pH 7,4
- Vyvolávací roztok (barvení stříbrem): 0,07% (v/v) formaldehyd, 3% (w/w) K₂CO₃, 0,001% (w/w) Na₂S₂O₃
- Zaostřovací polyakrylamidový gel pro SDS elektroforézu (5% (w/w)), V = 6 ml: 4,1 ml destilovaná voda; 1 ml 30% (w/w) akrylamid; 0,75 ml 1M TRIS pufr pH 6,8; 60 μ l 10% (w/w) SDS; 6 μ l TEMED a 60 μ l 10% (w/w) APS
- Zastavovací roztok (barvení stříbrem): 5% (w/w) TRIS, 25% (v/v) kyselina octová

3.4 Kultivační média

- LB medium: 10% (w/w) trypton, 5% (w/w) kvasničný extrakt, 10% (w/w) NaCl, pH 7,4
- LB agar: LB médium, 2% (w/w) agar
- M9 solný roztok: 36mM Na₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄, 9mM NaCl, 19mM NH₄Cl, pH 7,4

- M9 minimální médium (M9mm): solný roztok M9 minimálního média (viz výše) + 100 μ M CaCl₂, 1mM MgSO₄, 1mM thiamin hydrochlorid, 3 g/l glukóza

3.5 Bakteriální kmen

Escherichia coli BL21(DE3)

Stratagene, USA

3.6 Vektor

pET-30a(+)

Novagen, USA

Plasmid obsahující gen pro ligand vazebnou doménu myšního receptoru Nkr-p1b v rámci své diplomové práce připravila Mgr. Lucie Hernychová¹²⁴. Koncentrace zásobního roztoku byla 0,42 μ g/ μ l.

4 Metody

4.1 SDS elektroforéza

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS), který proteiny denaturuje a uděluje jim záporný náboj, byla využita pro analýzu vzorků proteinů a optimalizaci pracovního protokolu v průběhu renaturace a purifikace připravované ligand vazebné domény myšního proteinu Nkr-p1b (mNkr-p1b LBD, $M_w=15\ 469$ Da). Jedná se o nejběžnější z elektromigračních metod využívaných v biochemii. K rozdělení proteinů dochází na základě jejich různé elektroforetické mobility v polyakrylamidovém gelu, která je dána především velikostí proteinových molekul¹²⁵. Při provedení SDS elektroforézy v redukujícím vzorkovém pufru (obsahujícím dithiothreitol, jehož výsledná koncentrace ve vzorku byla 100mM) dochází k redukci disulfidických vazeb, a tím k rozvolnění sekundární struktury proteinu v příslušném vzorku. Vzorky v redukujícím vzorkovém pufru byly při přípravě 5 minut vařeny ve vodní lázni, vzorky v neredukujícím pufru vařeny nebyly.

4.1.1 Příprava vzorků pro SDS elektroforézu

- a) **Příprava vzorků pro SDS elektroforézu při výběru produkčních klonů (kap. 4.2.2, str. 43) a optimalizaci produkčních podmínek (kap. 4.2.3, str. 43):** K peletě buněk (získané centrifugací 1 ml buněčné kultury) bylo přidáno 100 μ l redukujícího vzorkového pufru. Vzorky byly 5 minut vařeny na vodní lázni a odstředěny (10 000 \times g, 5 min), následně byly nanášeny na polyakrylamidový gel v objemu 10 μ l na jamku.
- b) **Příprava vzorků proteinů z izolace inkluzních tělísek (kap. 4.2.4, str. 44), gelové filtrace (kap. 4.4, str. 46) a optimalizace stability (kap. 4.5, str. 47):** Bylo odebráno 7,5 μ l vzorku a k nim přidáno 7,5 μ l 2 \times koncentrovaného vzorkového pufru. Před nanášením na gel byly vzorky odstředěny (10 000 \times g, 5 min) a supernatant byl poté nanášen na gel po 10 μ l na jamku.
- c) **Příprava vzorků proteinů získaných renaturací metodou rychlého naředění (kap. 4.3, str. 45):** Ze vzorku solubilizovaného proteinu v guanidinovém pufru (po odstředění) byl odebrán 1 μ l a k němu bylo přidáno 199 μ l vzorkového pufru (1. provedení neredukující, 2. provedení redukující). K analýze renaturačního roztoku a dialyzovaného roztoku bylo odebráno po 10 μ l vzorku a smícháno s 10 μ l 2 \times koncentrovaného vzorkového pufru (redukující i neredukující podmínky). Před

nanášením na gel byly vzorky odstředěny ($10\,000\times g$, 5 min) a na gel bylo nanášeno po 15 μ l supernatantu na jamku.

- d) **Příprava markeru proteinových standardů:** Marker proteinových standardů byl před prvním použitím 10 min povařen ve vodní lázni. Před každým použitím byl pak odstředěn ($10\,000\times g$, 5 min) a nanášen v objemu 5 μ l na jamku.

4.1.2 Provedení SDS elektroforézy

Mezi elektroforetická skla byl nejprve nanesen 15% rozdělovací gel, který byl převrstven destilovanou vodou z důvodu zamezení přívodu kyslíku, který brání polymeraci gelu. Po 30 minutách tuhnutí gelu byla voda odstraněna a na rozdělovací gel byl nanesen 5% zaostřovací gel, do kterého byl umístěn hřeben pro vytvoření jamek na vzorky. Elektroforetická skla s připravenými gely byla následně umístěna do elektroforetické aparatury a převrstvena SDS elektrodočným pufrům. Po nanesení vzorků do jamek gelu byl aplikován konstantní proud 15 mA/gel a po přechodu vzorků do rozdělovacího gelu byl zvýšen na 25 mA/gel. Limitní hodnota napětí byla nastavena na 250 V. Po vyputování čela (vizualizovaného bromfenolovou modří) z gelu byla elektroforéza ukončena.

4.1.3 Vizualizace proteinů v polyakrylamidovém gelu

- a) **Barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250).** Gely byly vyjmuty z elektroforetických skel a 15 min míchány v barvicím roztoku a poté přeneseny do odbarvovacího roztoku, dokud nedošlo k odbarvení gelu v místech neobsahujících proteiny.
- b) **Barvení za využití stříbrných iontů.** Metoda barvení proteinů stříbrem je citlivější než barvení pomocí CBB. Využívá stříbrných iontů, které tvoří komplexy s proteiny. Tyto komplexy jsou následně redukovány za vzniku kovového stříbra. Touto metodou lze sledovat přítomnost proteinů v gelu již od 40 ng/cm^2 ^{126,127}.

Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen minimálně na 2 hodiny do odbarvovacího roztoku. Následně byl 10 min fixován ve 20% (v/v) roztoku ethanolu a 10 minut promýván destilovanou vodou. Dále byl inkubován v roztoku thiosíranu sodného ($c = 0,2\text{ g/l}$) po dobu jedné minuty a $2\times$ promyt destilovanou vodou. Následovala půlhodinová impregnace roztokem dusičnanu stříbrného ($c = 2\text{ g/l}$) a opětovné promytí destilovanou vodou. Gel byl poté přibližně tři minuty inkubován ve

vyvolávacím roztoku, dokud nebyly pozorovatelné proužky značící přítomnost proteinu. Barvení bylo ukončeno okyselením reakční směsi zastavovacím roztokem.

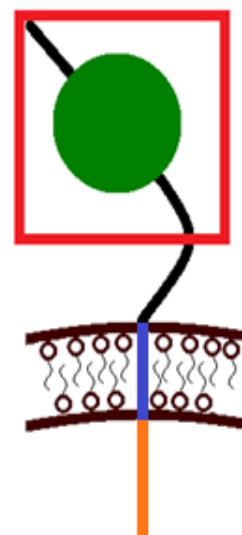
4.2 Rekombinantní exprese proteinu mNkr-p1b

Pro strukturní analýzu byl vybrán myší protein Nkr-p1b zkrácený o cytoplasmatickou a transmembránovou část. Tento zkrácený protein tedy obsahuje pouze ligand vazebnou doménu (LBD, z angl. Ligand binding domain, obr. 14), a to především CTLD doménu, která je důležitá pro vazbu ligandu (kap. 1.3.1.2, str. 30). V následujícím textu bude připravovaný protein označován jako mNkr-p1b LBD. Teoretická hodnota izoelektrického bodu ligand vazebné domény (LBD) proteinu Nkr-p1b je 5,15 a její molekulová hmotnost přibližně 15 469 Da.

WT	1	MDSTTLVYADLNLRARIQEPKHDSPPSLSPDTCRCPRWHLALKFGCAGLI	50
LBD	0	-----	0
WT	51	LLVLVVIIGLCVLLVLSVQKSSVQKICADVQENRHTTTDCSVNLECPQDWLS	100
LBD	1	-----SVNLECPQDWLS	12
WT	101	HRDKCFRVFQVSNTWEEGQADCGRKGATLLLIQDQEELRFLLDLSIKEKYN	150
LBD	13	<u>HRDKCFRVFQVSNTWEEGQADCGRKGATLLLIQDQEELRFLLDLSIKEKYN</u>	62
WT	151	SFWIGLRFTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKITGVTENGSCATISGDKVTSE	200
LBD	63	<u>SFWIGLRFTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKITGVTENGSCATISGDKVTSE</u>	112
WT	201	SCSTDNRWICQKELNHETPSNDS	223
LBD	113	<u>SCSTDNRWICQKELNHKTPSNDS</u>	135

WT	Nkr-p1b celý protein	223 aminokyselin
LBD	Nkr-p1b ligand vazebná doména	135 aminokyselin (WT 89-223)

CTLD
 Ligand vazebná doména
 Extracelulární část
 Transmembránová část
 Cytoplasmatická část



Obr. 14. Nkr-p1b a jeho ligand vazebná doména (LBD), která byla rekombinantně produkována za účelem určení struktury. Oranžově je značena cytoplasmatická část, modře transmembránová část, černě extracelulární část nesoucí CTLD doménu vyznačenou zeleně, červeně podtržená/ zarámovaná část je ligand vazebná doména (LBD). Původní organizmus myš domácí (*mus musculus*), myší kmen: BALB/c.

4.2.1 Transformace kompetentních buněk

Vnesení expresního vektoru pET-30a(+) obsahujícího gen pro mNkr-p1b LBD do kompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3) bylo provedeno metodou teplotního šoku. Ke 100 μ l kompetentních buněk bylo přidáno přibližně 100 ng expresního vektoru a tato směs byla ponechána půl hodiny na ledu. Poté byly buňky ponořeny do vodní lázně (42 °C po dobu 45 s) a následně k nim byl přidán 1 ml LB média bez antibiotik. Buňky byly inkubovány 1 hodinu při teplotě 37 °C a poté odstředěny (5000 \times g, 2 min). Supernatant byl odstraněn, získaná peleta byla zpětně resuspendována pouze ve 100 μ l supernatantu a nanášena na LB agarovou plotnu obsahující antibiotikum kanamycin ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) (expresní vektor nese rezistenci na kanamycin). Následovala inkubace při teplotě 37 °C přes noc. Druhý den bylo čtyřmi různými, dobře rozlišenými koloniemi zaočkováno vždy 4 ml LB média (obsahujícího kanamycin v koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$) a buňky se nechaly růst přes noc při teplotě 37 °C a 220 rpm. Takto byly získány 4 stacionární kultury transformovaných buněk.

4.2.2 Výběr produkčního klonu

Stacionární kulturou byl v poměru 1:100 zaočkován vždy 2 \times 1 ml LB média s kanamycinem ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) následovala inkubace po dobu 3 hodin při teplotě 37 °C a 220 rpm. Vždy k jedné z dvojice médií s buňkami (druhá sloužila jako kontrola) byl přidán induktor exprese isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) do výsledné koncentrace 1mM a všechny vzorky byly ještě další 2 hodiny inkubovány na třepačce při teplotě 37 °C. Vzorky byly následně odstředěny (5000 \times g, 10 min) a množství proteinu v získaných peletách buněk bylo analyzováno pomocí SDS elektroforézy (kap. 4.1, str. 40). Ze čtyř testovaných buněčných kultur pak byla vybrána ta, která vykazovala nejlepší produkční schopnosti (obsah exprimovaného proteinu byl nejvyšší).

4.2.3 Optimalizace produkčních podmínek v M9 minimálním médiu

Nejvhodnější podmínky pro maximální výtěžek exprimovaného proteinu byly optimalizovány v M9 minimálním médiu (M9mm). Byla optimalizována doba růstu buněk před indukcí (růstová křivka), koncentrace induktoru exprese IPTG (0,05mM - 1,5mM), produkční teplota (25 °C - 40 °C) a doba produkce proteinu (1 hod – 8 hod).

- a) **Optimalizace doby růstu buněk před indukcí:** Optimální doba inkubace před indukcí exprese proteinu pomocí IPTG byla určena z růstové křivky (graf závislosti optické

denzity buněčné kultury při 600 nm (OD_{600}) na inkubační době). Za ideální se považuje doba, za kterou hodnota OD_{600} vzroste na hodnotu mezi 0,6 a 0,8. Stacionární kulturou vybraného produkčního klonu bylo zaočkováno 100 ml M9mm v 0,5l Erlenmayerově baňce v poměru 1:100. Zároveň byl odebrán první vzorek pro spektrofotometrické stanovení OD_{600} a baňka s kulturou byla umístěna na třepačku a inkubována při teplotě 37 °C a 220 rpm. Následně byla každých 30 min měřena OD_{600} , překročila-li hodnota optické denzity hodnotu 0,8, vzorek byl před stanovením vhodně ředěn destilovanou vodou, a z naměřených dat byla sestavena růstová křivka.

- b) **Optimalizace koncentrace induktoru exprese, produkční teploty a doby produkce:** Stacionární kulturou byl v poměru 1:100 zaočkován vždy 1 ml M9mm a inkubován na třepačce při teplotě 37 °C. Při hodnotě $OD_{600} \approx 0,7$ bylo přidáno IPTG do výsledné koncentrace 1 mM (0,05mM - 1,5mM při optimalizaci koncentrace IPTG). Vzorky byly dále inkubovány při 37 °C (25 °C - 40 °C při optimalizaci teploty) po dobu 3 hod (1 hod – 8 hod při optimalizaci doby produkce). Ihned po inkubaci byly vzorky centrifugovány (5000×g, 10 min) a množství proteinu v peletách buněk analyzováno pomocí SDS elektroforézy (kap. 4.1, str. 40).

4.2.4 Produkce proteinu v M9 minimálním médiu a izolace inkluzních tělísek

Přibližně 70 % všech rekombinantních proteinů produkovaných v *E. coli* pomocí silných expresních systémů je ukládáno do takzvaných inkluzních tělísek (cytoplasmatické agregáty proteinů). Tato inkluzní tělíška se skládají především ze silně exprimovaného rekombinantního proteinu a jejich vratnou denaturací a následnou renaturací v roztoku může být získán rekombinantní protein ve svém nativním stavu (kap.1.1.3, str. 18)^{128,129}.

Do 2l Erlenmayerových baněk bylo připraveno po 0,5 l M9 solného roztoku. Solný roztok byl sterilizován horkou parou v autoklávu a po jeho zchladnutí byl použit pro přípravu M9 minimálního média (viz složení médií, kap. 3.4, str. 38). Roztoky vápenaté a hořečnaté soli byly rovněž sterilizovány horkou parou, kanamycin, glukóza a vitamín B1 byly sterilizovány filtrací (mikrofiltr 22 µm). Výhodou M9 minimálního média (M9mm) jsou definované zdroje uhlíku (glukóza) a dusíku (chlorid amonný) využívané buňkami pro tvorbu nových struktur. Připravené M9mm bylo zaočkováno čerstvou stacionární kulturou v poměru 1:100 a inkubováno na třepačce při teplotě 37 °C. Po 4,5 hodině byla zahájena exprese proteinu přidáním induktoru exprese IPTG ($c = 0,4$ mM) a buněčná kultura byla

inkubována při teplotě 37 °C ještě další 3 hodiny. Expres proteinu byla ukončena 10minutovou centrifugací při 8 000×g a teplotě 4 °C. Získaná peleta buněk byla před purifikací proteinu uchovávána při teplotě -80 °C.

Peleta buněk obsahující daný protein byla resuspendována v sacharózovém lyzačním pufru (20 ml pufru na peletu z 1 l produkčního média), do kterého byly přidány inhibitory proteáz leupeptin ($c = 10 \mu\text{M}$) a fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, $c = 1 \text{ mM}$). Získaný roztok byl homogenizován ultrazvukovou sondou (30 s) a zmrazen (-80 °C), následně rozmrazen, sonikován a opět zmrazen. Tento postup homogenizace byl celkem čtyřikrát zopakován. K buněčnému lyzátu byly přidány enzymy DNáza I ($c = 10 \text{ U/ml}$), RNáza A ($c = 2,5 \mu\text{g/ml}$) a hořečnaté ionty ve formě roztoku MgCl_2 ($c = 20 \text{ mM}$). Suspenze byla ponechána 30 min při laboratorní teplotě a v průběhu byla dvakrát sonikována ($2 \times 20 \text{ s}$). Suspenze byla odstředěna (17 500×g, 15 min, 4 °C) a peleta byla pomocí ultrazvukové sondy ($3 \times 10 \text{ s}$) resuspendována (20 ml pufru na peletu z 1 l produkčního média) v promývacím pufru pro izolaci inkluzních tělísek, do kterého byl přidán detergent (0,5% (w/w) Triton X-100) a inhibitory proteáz leupeptin a PMSF ve stejné koncentraci jako v předchozím případě. Následovala opět centrifugace (17 500×g, 15 min, 4 °C) a resuspendace pelety ve stejném objemu promývacího pufru pro izolaci inkluzních tělísek s inhibitory proteáz, ale tentokrát bez detergentu. Nakonec byla suspenze opět odstředěna (17 500×g, 15 min, 4 °C) a peleta obsahující promytá inkluzní tělíska byla zamrazena a uchovávána při teplotě -80 °C. V průběhu izolace inkluzních tělísek byly odebírány vzorky pro následnou analýzu pomocí SDS elektroforézy (kap. 4.1, str. 40).

4.2.5 Produkce izotopově značeného proteinu

Při přípravě izotopově značeného proteinu mNkr-p1b LBD, potřebného pro NMR experimenty, bylo postupováno tak, jak uvádí kapitola 4.2.4 (str. 44). Při přípravě M9 solného roztoku ale bylo jako zdroje dusíku využito $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ namísto $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ a jako zdroje uhlíku byla místo standardní glukózy použita glukóza složená z izotopů uhlíku ^{13}C .

4.3 Renaturace proteinu

Pro renaturaci proteinu z inkluzních tělísek byla použita metoda rychlého naředění, při které je reverzibilně denaturovaný protein přikapáván do velkého objemu renaturačního pufru temperovaného na teplotu 4 °C. Tento pufr obsahuje vysokou koncentraci L-argininu,

který plní funkci nízkomolekulárního chaperonu, a napomáhá tak správnému sbalení proteinu.

Získaná inkluzní tělíska byla nejprve solubilizována v guanidinovém pufru (na 1 g inkluzních tělísek 8 ml pufru). Resuspendace inkluzních tělísek byla usnadněna krátkou sonikací a získaný roztok byl pak inkubován jednu hodinu při teplotě 40 °C ve vodní lázni. Následně byl roztok odstředěn (30 000×g, 30 min, 20 °C) a získaný supernatant byl přikapán (cca 20 μl kapky) do renaturačního pufru (objem guanidinového pufru × 100) temperovaného na 4 °C a další hodinu byl při této teplotě míchán. Renaturační roztok byl následně převeden do dialyzačních trubic a dialyzován proti dialyzačnímu pufru (objem renaturačního pufru × 10) při teplotě 4 °C po dobu 4 hodin (ve výsledcích označeno jako „dialýza I“). Dialyzační trubice obsahující vzorek proteinu byly poté převedeny do stejného objemu čerstvého dialyzačního pufru vytemperovaného na 4 °C a při této teplotě míchány po dobu dalších 12 hodin (ve výsledcích označeno jako „dialýza II“).

Roztok obsahující renaturované proteiny byl dále zakoncentrován pomocí ultrafiltrace v ultrafiltrační cele pod tlakem inertního plynu (N₂) za použití celulózové membrány (s limitem propustnosti 10 kDa). Po zakoncentrování roztoku na objem přibližně 50 ml byly odstředěny (30 000×g, 30 min, 4 °C) vzniklé proteinové agregáty a další nečistoty. Protein v supernatantu byl dále zakoncentrován za použití centrifugačních kyvet s filtrační membránou (s limitem propustnosti 10 kDa). Centrifugace probíhala při teplotě 4 °C a 3500×g, doba centrifugace byla volena tak, aby nedocházelo k vysychání zakoncentrovávaného vzorku na filtrační membráně a při jeho jednotlivých přidavcích byl vždy celý objem vzorku jemně promíchán za pomoci pipety, aby bylo zamezeno případné sedimentaci. Při zakoncentrovávání byla průběžně sledována koncentrace proteinů ve vzorku (kap. 4.6, str. 47), neboť čím vyšší je koncentrace proteinů, tím větší je poměr agregátů vůči monomerní formě proteinu. Monomer proteinu mNkr-p1b LBD byl poté od vyšších oligomerů (agregátů) separován pomocí gelové filtrace.

4.4 Gelová filtrace

Protein mNkr-p1b LBD získaný izolací z inkluzních tělísek a následnou renaturací byl dále purifikován pomocí gelové filtrace (neboli gelové permeační chromatografie). Tato metoda slouží k rozdělení molekul na základě jejich hydrodynamického objemu. Nejrychleji kolonou procházejí velké molekuly, které téměř nepronikají do pórů stacionární fáze. Menší

částice naopak do pórů pronikají, a tím dochází k jejich zdržení v chromatografické koloně¹³⁰.

Kolona (Superdex 75 HR 10/300) byla ekvilibrována 36 ml pufru pro gelovou filtraci. Centrifugací (10 000×g, 10 min) byly před nanesením vzorku na kolonu odstraněny nečistoty a případné denaturované proteiny. Doporučená koncentrace proteinů v nanášce pro gelovou filtraci je < 5 mg/ml. Průtoková rychlost mobilní fáze byla nastavena na 1 ml/min. Eluovaný protein byl detekován spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Jímané frakce byly následně analyzovány pomocí SDS elektroforézy (kap. 4.1, str. 40) a byla změřena koncentrace získaného proteinu.

4.5 Optimalizace stability proteinového vzorku

Při purifikaci proteinu mNkr-p1b LBD bylo nejprve použito fosfátového pufru (PBS) se sníženým obsahem soli (50 mM) jako mobilní fáze při gelové filtraci, a tedy i jako výsledného pufru pro uchovávání proteinu. Bylo ale zjištěno (na základě výsledků SDS elektroforézy, hmotnostní spektrometrie a NMR), že v tomto pufru není daný protein dostatečně stabilní. Pro přípravu vzorku proteinu pro NMR experimenty proto bylo nutné vybrat jiné složení pufru. Zvoleny byly dva pufrы: první založený na kyselině piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonové] (PIPES) a druhý na kyselině 4-(2-hydroxyethylen)-1-piperazinethansulfonové (HEPES). Vzorek proteinu v těchto pufrách byl ponechán při laboratorní teplotě a průběžně byla pomocí SDS elektroforézy, NMR a hmotnostní spektrometrie kontrolována jeho homogenita (stabilita).

4.6 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinu byla stanovována spektrofotometricky měřením absorbance při 280 nm za využití známé molekulové hmotnosti (15 469 Da) a molárního extinkčního koeficientu ($34\,865\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) proteinu mNkr-p1b LBD.

4.7 Dynamický rozptyl světla

Pro ověření monodisperzity vzorku bylo využito metody dynamického rozptylu světla (DLS, kap. 1.2.4, str. 27). Tyto experimenty byly provedeny doktorkou Tatsianou Charnavets (Biotechnologický ústav AV ČR). Vzorek proteinu o koncentraci 0,16 mg/ml byl analyzován ve skleněné kyvetě o rozměrech 12×12 mm při laboratorní teplotě pomocí

systemu Zetasizer Nano ZS90. Jako světelný zdroj byl použit laser emitující záření o vlnové délce 633 nm a rozptýlené záření bylo následně detekováno pod úhlem 90°.

4.8 Vyhodnocení NMR spekter

NMR experimenty byly provedeny doktorem Josefem Chmelíkem (Mikrobiologický ústav AV ČR) na spektrometru Bruker Avance III vybaveným TCI-kryosondou s pozorovací frekvencí pro vodík 700 MHz, měření probíhalo při teplotě 303 K. Nejprve byla měřena jednou izotopově značená (^{15}N) verze proteinového vzorku pro ověření, že je protein ve svém nativním stavu. Dvakrát izotopově značený vzorek byl pak využit k naměření NMR spekter pro strukturní analýzu. Naměřená NMR spektra byla zpracovávána a vyhodnocována pomocí programu Sparky (verze 3.114)¹³¹. Přiřazování a popis jednotlivých signálů byl prováděn manuálně (kap. 1.2.3.3, str. 26).

4.8.1 2D- ^1H , ^{15}N -HSQC experiment

V experimentu HSQC je magnetizace pomocí J-interakce přenesena z vodíku na kovalentně vázaný dusík ^{15}N a zpět na vodík, kde dochází k detekci signálu. Tento experiment zaznamená všechny ^1H - ^{15}N páry ve vzorku, to znamená všechny vodíky vázané na dusíky peptidové páteře (není pozorovatelný signál prolinu). V HSQC (z angl. Heteronuclear single quantum coherence) experimentu jsou také viditelné signály z postranních řetězců aminokyselin tryptofanu, asparaginu, glutaminu a argininu. Na základě rozlišitelnosti jednotlivých signálů lze usuzovat, zda je protein v nativní konformaci. V prvním kroku byly označeny a náhodně očíslovány všechny nalezené signály v HSQC spektru.

4.8.2 3D- ^1H , ^{13}C , ^{15}N -experimenty

Za účelem dostatečného rozlišení signálů byly v rámci této práce naměřeny 3D NMR experimenty (využité experimenty: tab. 1, str. 49) využívající přenosu magnetizace mezi jádru ^1H , ^{13}C a ^{15}N . V tabulce jsou znázorněny signály určitých jader nacházejících se v příslušných spektrech.

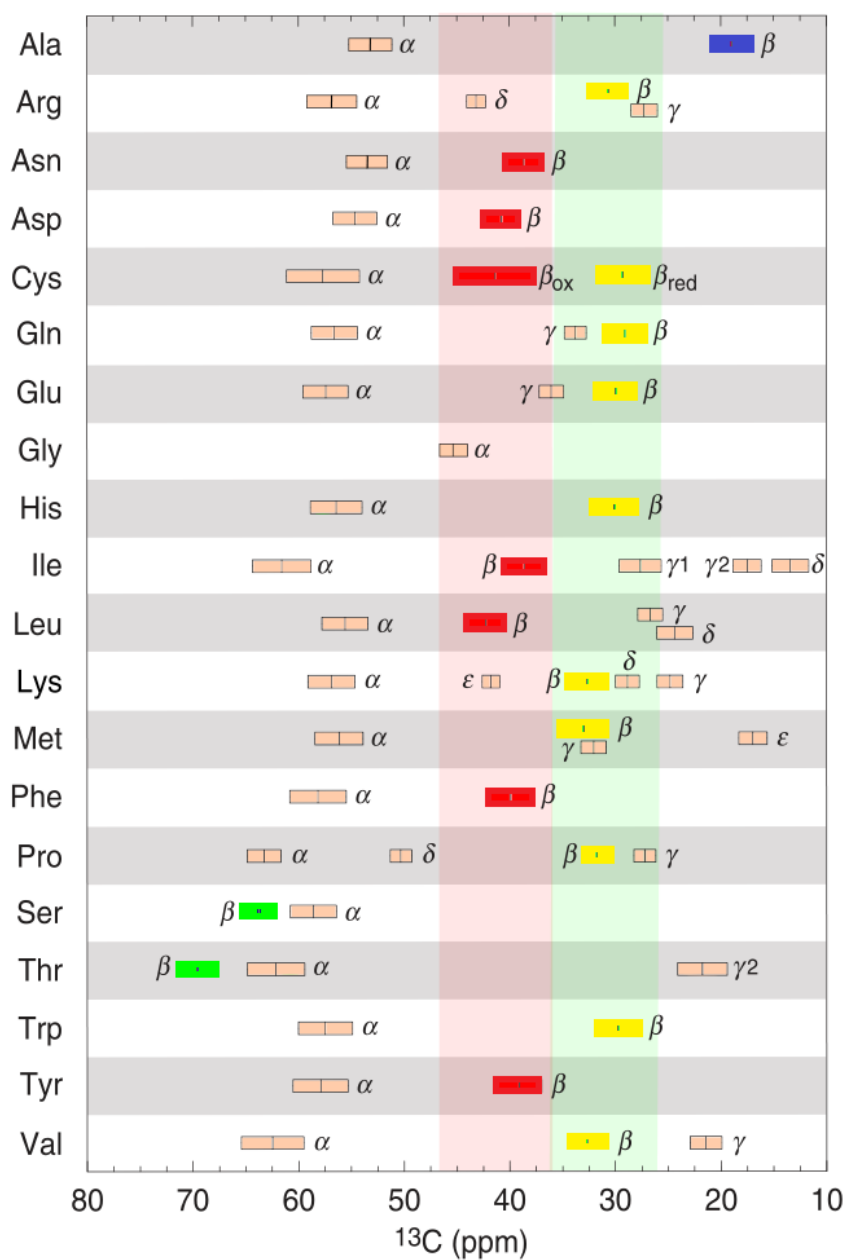
Tab. 1. Využití 3D NMR experimenty. Signály alfa uhlíku (C^α), beta uhlíku (C^β) a karbonylového uhlíku (C'). Tyto experimenty jsou detailněji popsány níže.

experiment	jádro			signál atomu					
	osa x	osa y	osa z	$C^\alpha(i-1)$	$C^\alpha(i)$	$C^\beta(i-1)$	$C^\beta(i)$	$C'(i-1)$	$C'(i)$
HNCA	^1H	^{13}C	^{15}N	☉	☉				
HN(CO)CA	^1H	^{13}C	^{15}N	☉					
HNCACB	^1H	^{13}C	^{15}N	☉	☉	☉	☉		
CBCA(CO)NH	^1H	^{13}C	^{15}N	☉		☉			
HN(CA)CO	^1H	^{13}C	^{15}N					☉	☉
HNCO	^1H	^{13}C	^{15}N					☉	

Ve 3D experimentech byly také označeny a očíslovány všechny signály podle signálů v 2D HSQC spektru.

4.8.3 Metody přiřazení signálů jednotlivým atomům

Každé jádro má díky svému specifickému magnetickému okolí vlastní rezonanční frekvenci, která vztahovaná ke standardu dává chemický posun. Typické hodnoty chemických posunů pro jednotlivé aminokyselinové zbytky jsou známy a pomáhají při přiřazování signálů k jednotlivým atomům v rámci proteinu. Důležitým jádrem pro přiřazení příslušných signálů k aminokyselinové sekvenci studovaného proteinu (kterou je třeba znát) je jádro C^β , na základě jehož chemických posunů lze aminokyseliny rozdělit do několika skupin. Gly nemá beta uhlík, a proto ani C^β signál. Ala má C^β a jeho chemický posun se pohybuje okolo 20 ppm. Chemické posuny C^β Arg, Gln, Glu, His, Lys, Met, Pro, Trp, Val a redukovaného Cys se pohybují okolo 30 ppm. Asn, Asp, Ile, Leu, Phe, Tyr a oxidovaný Cys mají C^β chemické posuny okolo 40 ppm. Největší chemické posuny mají Ser a Thr, a to okolo 60-70 ppm⁶⁷. Hodnoty typických chemických posunů uhlíkových atomů jednotlivých aminokyselin jsou vyobrazeny na obrázku 15 (str. 50).

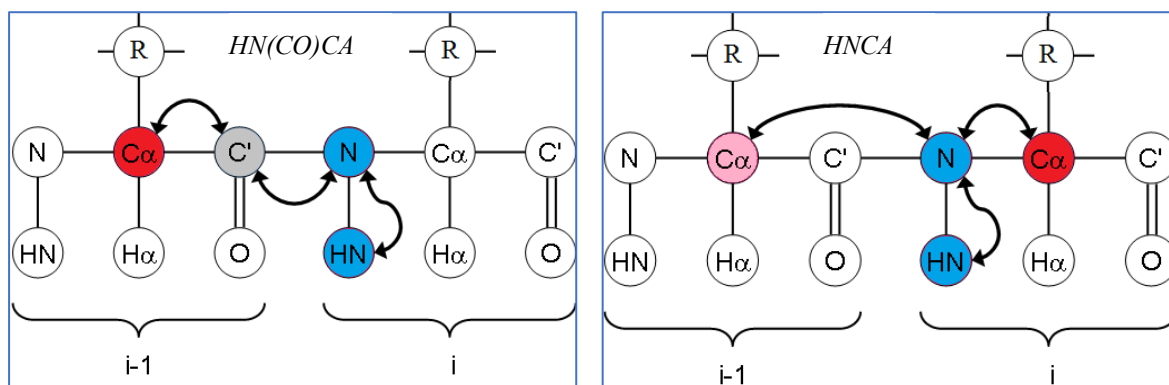


Obr. 15. Typické chemické posuny uhlíkových atomů jednotlivých aminokyselin. Barevně jsou vyznačeny posuny C^β uhlíků. Zeleně jsou vyznačeny chemické posuny C^β serinu a threoninu, které se pohybují okolo 60-70 ppm. Červeně jsou zvýrazněny chemické posuny C^β aminokyselin, které se pohybují okolo 40 ppm, žlutě aminokyseliny s C^β chemickými posuny okolo 30 ppm a modře je vyznačen posun C^β alaninu nacházející se okolo 20 ppm. Převzato a upraveno z¹⁴².

Kvůli překryvům v chemických posunech C^β je v některých částech přiřazované sekvence nezbytné využít k identifikaci aminokyseliny i chemické posuny jader jejich postranních řetězců.

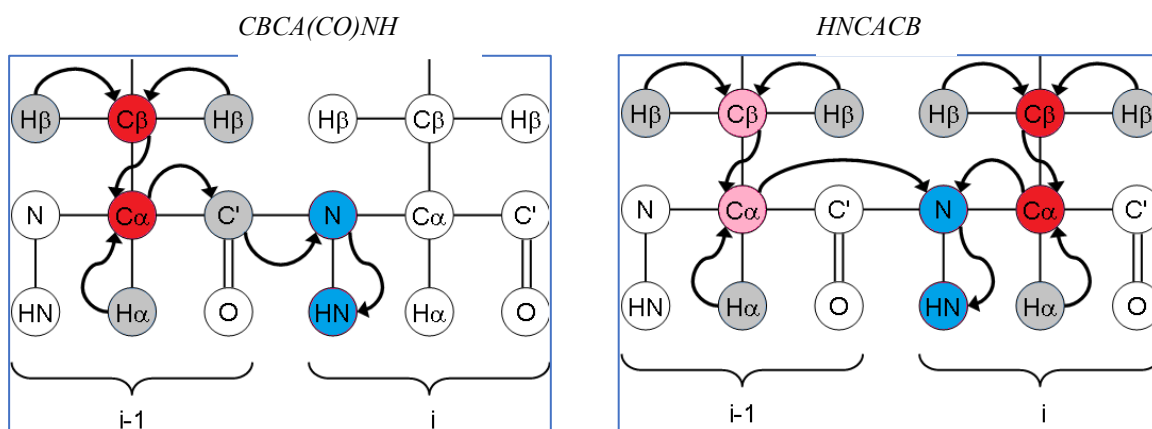
4.8.3.1 Metody přiřazení uhlíků C^α , C^β a C'

HN(CO)CA a HNCA spektra (obr. 16). V HN(CO)CA spektru signál $C^\alpha(i-1)$ koreluje s amidovou skupinou následující aminokyseliny (sekvence aminokyselin se zapisuje od N-konce k C-konci). Zatímco v HNCA spektru je především signál $C^\alpha(i)$ korelující s HN vlastní aminokyseliny a slabší $C^\alpha(i-1)$ aminokyseliny předcházející. V ideálním případě by mělo být možné přiřadit jednotlivé signály C^α aminokyselinové sekvenci pouze za pomoci těchto dvou spekter.

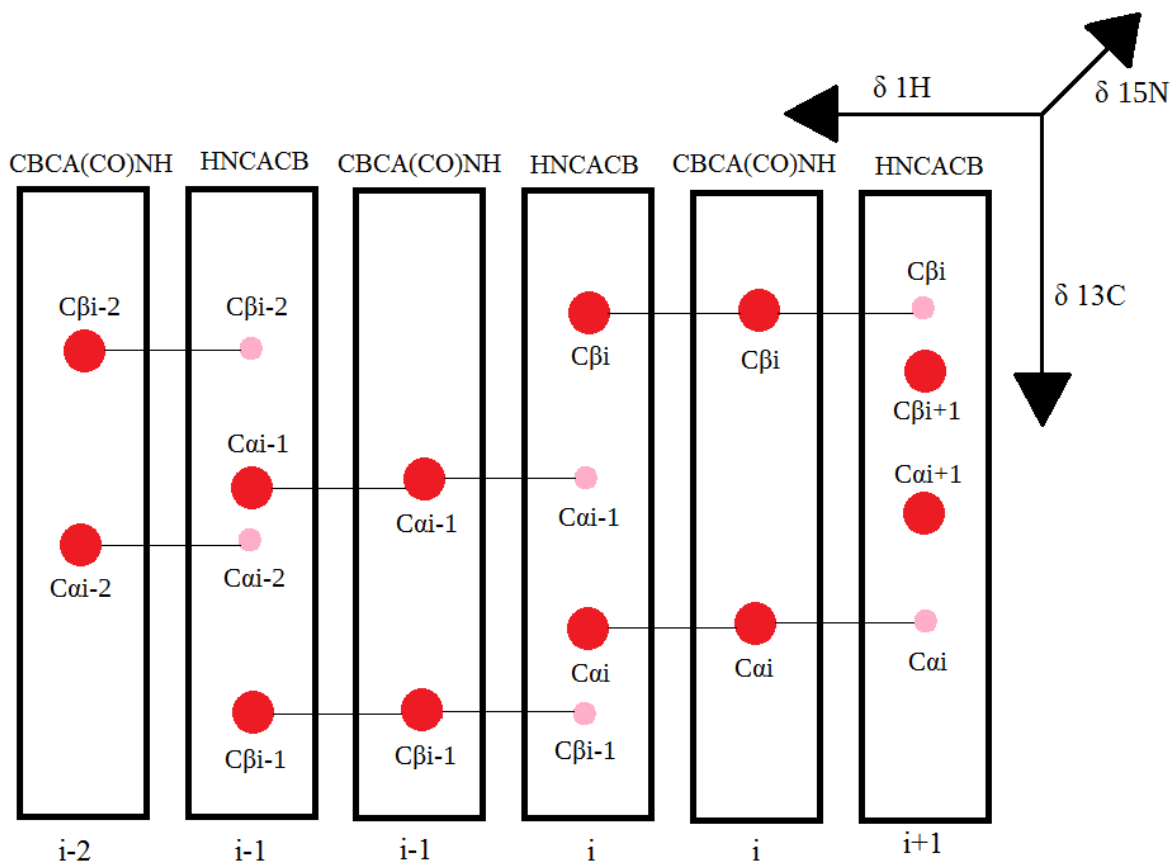


Obr. 16. Přenos magnetizace při HN(CO)CA a HNCA experimentech¹⁴².

Pro přiřazování C^β signálů bylo využito spekter CBCA(CO)NH a HNCACB (obr. 17 a obr. 18, str. 52). Ve spektru CBCA(CO)NH jsou viditelné signály $C^\alpha(i-1)$ a $C^\beta(i-1)$. V HNCACB jsou intenzivnější signály $C^\alpha(i)$ a $C^\beta(i)$ a méně intenzivní $C^\alpha(i-1)$ a $C^\beta(i-1)$. Tato spektra tedy poskytují komplementární informaci o chemických posunech C^α , oproti HN(CO)CA a HNCA mají však nižší citlivost.

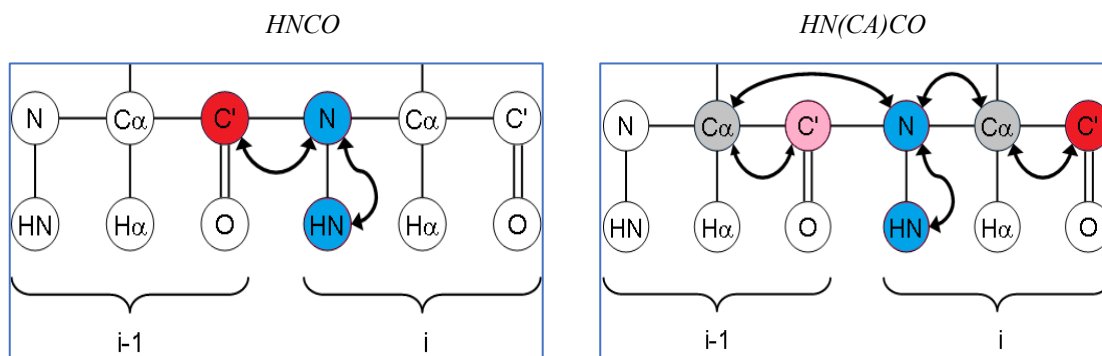


Obr. 17. Přenos magnetizace při CBCA(CO)NH a HNCACB experimentech¹⁴².



Obr. 18. Princip přiřazování aminokyselinové sekvence k signálům s využitím CBCA(CO)NH a HNCACB spekter. „i“ značí libovolný aminokyselinový zbytek, „i-1“ značí aminokyselinový zbytek tomuto předcházející, analogický význam mají i označení „i-2“ a „i+1“.

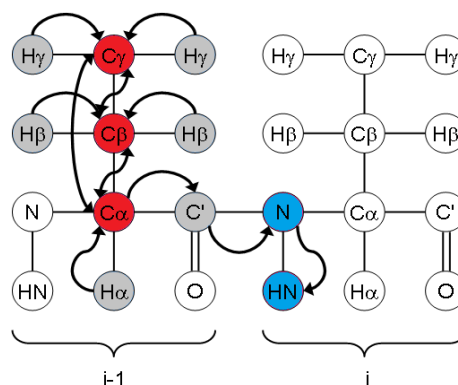
Signály C' byly přiřazeny ze spekter HNCO a HN(CA)CO (obr. 19). V experimentu HNCO je signál C'(i-1) odpovídající karbonylovému uhlíku navázanému na dusík následující aminokyseliny. Spektrum HN(CA)CO má opět dva signály C'(i) a C'(i-1).



Obr. 19. Přenos magnetizace při HNCO a HN(CA)CO experimentech¹⁴².

4.8.3.2 Metody přiřazení signálů atomům aminokyselinových zbytků

Ve spektru $(H)CC(CO)NH$ (obr. 20) jsou korelovány všechny uhlíky z postranního řetězce s NH skupinou předchozího aminokyselinového zbytku. Dále byly provedeny experimenty pro přiřazení rezonančních frekvencí vodíkovým atomům postranních řetězců aminokyselin $H(CC)(CO)NH$, HN-TOCSY-HSQC, HCCH-TOCSY a NOESY, které však v rámci této práce nebyly využity.



Obr. 20. Přenos magnetizace při $(H)CC(CO)NH$ experimentu¹⁴².

4.9 Metody určení zastoupení sekundárních struktur

K predikci zastoupení sekundárních struktur bylo použito metody cirkulárního dichroismu (CD, kap. 1.2.5, str. 28). Tyto experimenty byly provedeny dr. Tatsianou Charnavets. Pomocí CD spektrometru ChirascanTM-plus bylo proměřeno spektrum od 190 nm do 260 nm po 1 nm krocích. Koncentrace proteinu ve vzorku byla 0,1 mg/ml, měření probíhalo za laboratorní teploty v křemenné kyvetě s délkou optické dráhy 1 mm. CD signál byl vyjádřen jako elipticita a od naměřeného spektra bylo odečteno pozadí pufru. K predikci zastoupení sekundárních struktur bylo využito softwaru CDNN (z angl. Circular dichroism neural network)¹³².

Zastoupení sekundárních struktur v molekule proteinu mNkr-p1b LBD bylo odhadnuto také na základě aminokyselinové sekvence proteinu za využití softwaru pro predikci sekundárních struktur PSIPRED (z angl. Protein structure prediction) dostupného online¹³³

Dalším softwarem využitým k odhadu zastoupení sekundárních struktur byl software TALOS+ (z angl. Torsion angle likelihood obtained from shift and sequence similarity)¹³⁴. V tomto případě byly jako vstupní data využity hodnoty chemických posunů jednotlivých jader získaná analýzou NMR spekter (viz přílohy, str. 86). Program TALOS+ porovnává hodnoty chemických posunů jednotlivých jader s tabelovanými hodnotami chemických posunů pro specifické sekundární struktury.

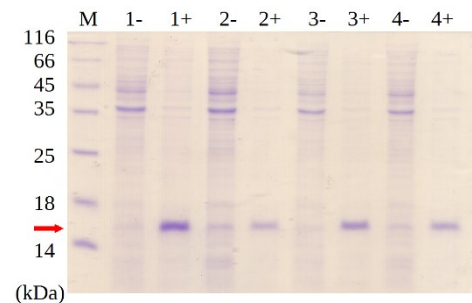
4.10 Určení modelu trojrozměrné struktury

Pro vytvoření modelu trojrozměrné struktury proteinu mNkr-p1b LBD bylo využito softwaru GeNMR (z angl. Generate NMR structure)¹³⁵. Při tvorbě modelu prezentovaného v předkládané diplomové práci bylo využito hodnot chemických posunů získaných vyhodnocením NMR spekter (viz přílohy str. 86) a známých struktur strukturně podobných proteinů. Byly využity struktury (i) aktivačního NK buněčného receptoru, Nkr-p1a (NMR: 2MTI, X-ray: 3T3A), (ii) C-lektinového receptoru dendritických buněk, Lox1 (1YPO), (iii) C-lektinového ligandu lidského NKR-P1A, LLT1 (4QKH), (iv) aktivačního receptoru lidských NK buněk, Nkp65 (4IOP), (v) receptoru C-lektinového typu CLEC5A (2YHF) a (vi) receptoru C-lektinového typu NKG2D (4PP8). Všechny tyto struktury obsahují CTLD doménu.

5 Výsledky

5.1 Výběr vhodného produkčního klonu

Metodou teplotního šoku byl do produkčního kmene *E. coli* BL21 (DE3) vnesen vektor pro rekombinantní expresi proteinu mNkr-p1b LBD (kap. 4.2.1, str. 43). Získané stacionární kultury 1, 2, 3 a 4 byly podrobeny testu exprese rekombinantního proteinu. Výběr vhodného produkčního klonu byl proveden na základě SDS elektroforézy (obr. 21). Pro další experimenty byla vybrána kultura 1, která vykazovala nejlepší produkční vlastnosti, tzn. množství exprimovaného proteinu bylo nejvyšší (viz 3. dráha v obr. 21).

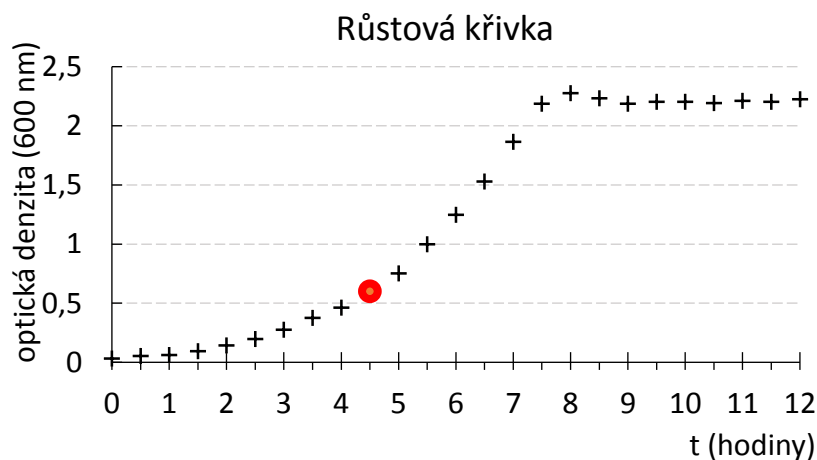


Obr. 21. Výsledek SDS elektroforézy pro výběr vhodného produkčního klonu. Ve vzorcích v drahách označených "+" byla indukována exprese rekombinantního proteinu pomocí IPTG, v drahách označených "-" nikoliv. Čísly (1-4) jsou označeny jednotlivě vybrané kolonie buněk. Protein mNkr-p1b LBD (15,5 kDa) je v obrázku značen červenou šipkou. M-marker.

5.2 Optimalizace produkčních podmínek

Za účelem co nejvyšší efektivity, rychlosti a co nejnižších finančních nákladů byly provedeny experimenty pro stanovení optimálních podmínek pro produkci rekombinantního proteinu v M9 minimálním médiu (kap. 4.2.3, str. 43).

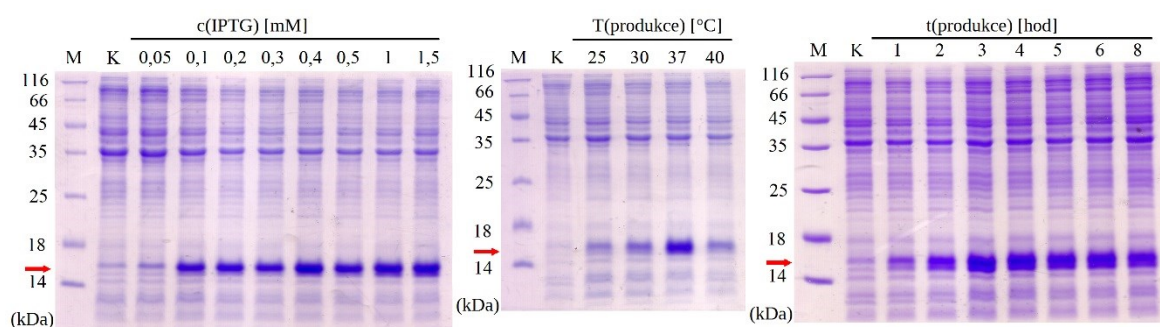
Optimální doba inkubace před indukcí exprese rekombinantního proteinu byla vybrána na základě hodnot růstové křivky (obr. 22). Stanovení probíhalo



Obr. 22. Růstová křivka bakteriálního produkčního kmene. Indukce exprese byla prováděna po 4,5 hodinách inkubace.

spektrofotometricky při 600 nm. Jako vhodný čas inkubace před indukcí exprese byla zvolena doba 4,5 hodiny, kdy je hodnota optické denzity přibližně 0,6.

Podmínky exprese proteinu byly optimalizovány analýzou exprese rekombinantního proteinu za různých podmínek: různé koncentrace induktoru exprese (IPTG), různé produkční teplotě a různé době produkce (obr. 23). Jako optimální koncentrace induktoru exprese (IPTG) byla zvolena koncentrace 0,4 mM, optimální teplota pro produkci je 37 °C a doba produkce 3 hodiny.



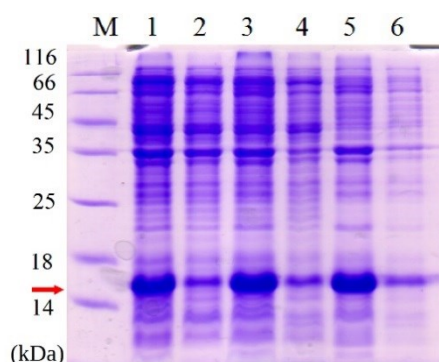
Obr. 23. Výsledky SDS elektroforézy z optimalizace produkčních podmínek. Optimalizovány byly koncentrace induktoru exprese IPTG (vlevo), produkční teplota (uprostřed) a doba produkce (vpravo). Červenou šipkou je označen protein mNkr-p1b LBD. M - marker, K - kontrola (bakteriální kultura před přidáním induktoru exprese).

5.3 Příprava ^{13}C , ^{15}N značeného proteinu

V $2 \times 0,5$ l M9 minimálního média byl za využití optimalizovaných podmínek produkován rekombinantní protein mNkr-p1b LBD. Po ukončení exprese byla produkční kultura odstředěna a získané buňky byly homogenizovány. Ze získaného buněčného lyzátu byla následně izolována inkluzní tělíska (kap. 4.2.4 a 4.2.5, str. 44 a 45) a jednotlivé kroky izolace byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy (obr. 24, tab. 2).

Tab. 2. Legenda k obr. 24.

dráha	vzorek
M	marker
1	buňky <i>E.coli</i> resuspendované v sacharózovém lyzačním pufru
2	cytosolární frakce buněk <i>E.coli</i> v sacharózovém lyzačním pufru po centrifugaci
3	peleta zlyzovaných buněk <i>E.coli</i> resuspendovaná v promývacím pufru s detergentem
4	supernatant po centrifugaci pelety resuspendované v promývacím pufru s detergentem
5	peleta zlyzovaných buněk <i>E.coli</i> resuspendovaná v promývacím pufru bez detergentu
6	supernatant po centrifugaci pelety resuspendované v promývacím pufru bez detergentu



Obr. 24. Výsledek SDS elektroforézy z izolace inkluzních tělísek. Obsah jednotlivých drah popisuje tab. 2. Červená šipka označuje protein mNkr-p1b LBD.

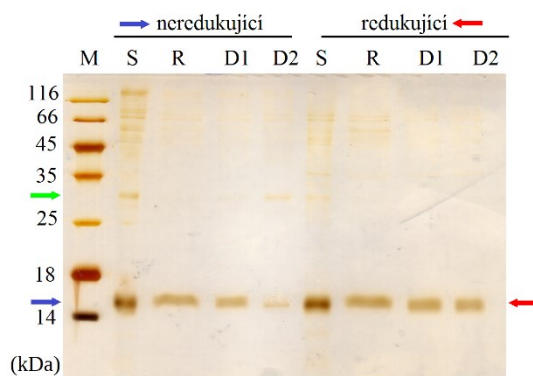
Z výsledků uvedených na obrázku 24 je zřejmé, že většina proteinu mNkr-p1b LBD se v buňkách vyskytuje ve formě inkluzních tělísek. Cytosolární frakce buněk *E.coli* (dráha 2) obsahuje ve srovnání s buněčným lyzátem před centrifugací (dráha 1) daleko méně daného proteinu. Porovnáme-li množství proteinu obsaženého v lyzátu (dráha 1) a výsledná pročištěná inkluzní tělíska (dráha 5), můžeme říci, že ztráty jsou velmi malé. Dochází k nabohacení proteinu mNkr-p1b LBD oproti ostatním proteinům, což je výhoda ukládání proteinu zájmu do formy inkluzních tělísek (většina buněčných proteinů je rozpustná a tímto postupem se oddělí).

5.3.1 Renaturace a dialýza

Inkluzní tělíska byla solubilizována ve 4M guanidinovém pufru, získaný roztok obsahující reverzně denaturovaný protein byl přikapán do renaturačního pufru a následnou dialýzou byl protein v nativním stavu převeden do podmínek blízkých fyziologickým (kap. 4.3, str. 45). Jednotlivé kroky renaturace byly sledovány pomocí SDS elektroforézy (obr. 25, tab. 3). Na obrázku 25 je možné si všimnout v neredukujících podmínkách v drahách S a D2 proužku, který svou molekulovou hmotností odpovídá dimeru proteinu Nkr-p1b LBD (31 kDa: na obr. 25 označen zelenou šipkou). V inkluzních těliscích (dráha S) se tedy tento protein vyskytuje jak ve formě monomeru, tak ve formě dimeru. Po renaturaci (dráha R) je převážná část proteinu ve formě monomeru, avšak během dialýzy dochází postupně k tvorbě dimeru, a tím úbytku monomeru (dráha D2). Toto pozorování potvrzují i výsledky gelové filtrace (kap. 5.3.2, str. 59).

Tab. 3. Legenda k obr. 25.

dráha	vzorek
M	marker
S	solubilizovaná inkluzní tělíska
R	protein mNkr-p1b LBD po renaturaci
D1	protein mNkr-p1b LBD po dialýze 1 (4 hod)
D2	protein mNkr-p1b LBD po dialýze 2 (16 hod)



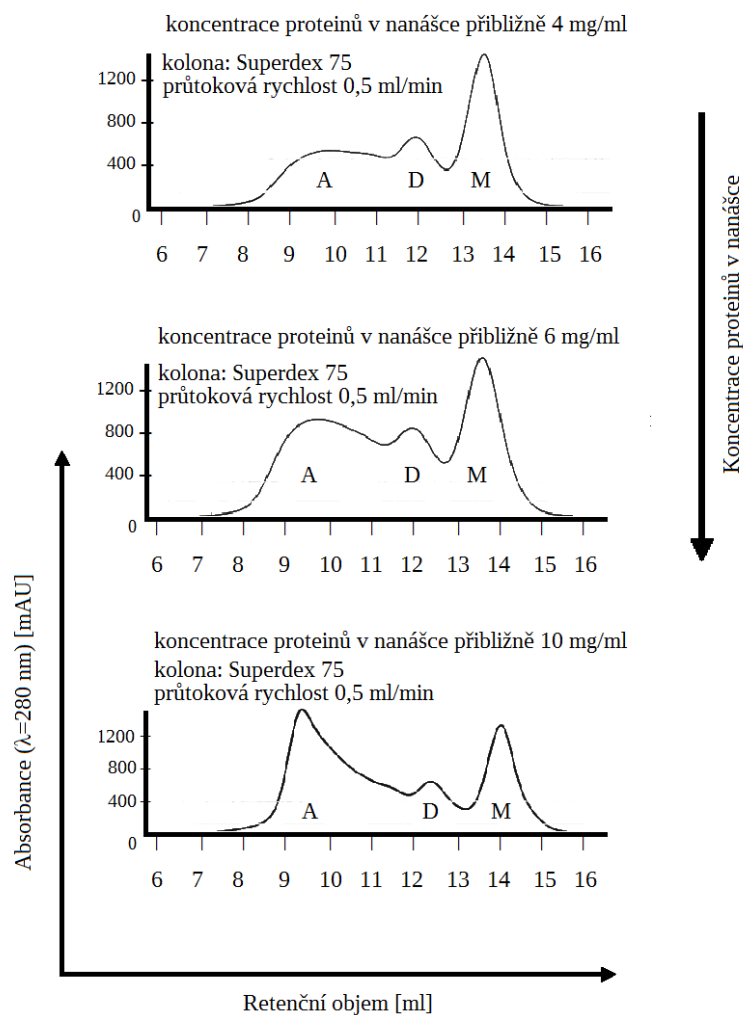
Obr. 25. Výsledek SDS elektroforézy z renaturace proteinu. Obsah jednotlivých drah popisuje tab. 3. Šipky označují protein mNkr-p1b LBD. Modrá a červená šipka značí monomer (15,5 kDa), zelená dimer (31 kDa).

Po dialýze byl roztok obsahující protein v nativním stavu zakonzentrován na menší objem (při produkci v 1 l M9mm běžně na 4 ml) o koncentraci proteinů přibližně 5 mg/ml.

5.3.2 Purifikace proteinu pomocí gelové filtrace

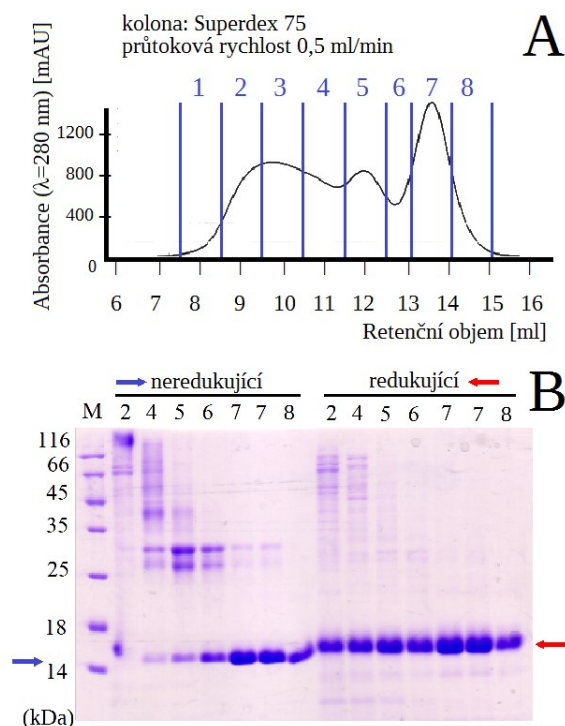
K purifikaci proteinu mNkr-p1b LBD a k jeho převedení do pufru vhodnějšího pro NMR experimenty bylo využito gelové filtrace (GF, kap. 4.4, str. 46). Ze získaných chromatogramů (obr. 26) vyplývá, že připravený vzorek obsahoval kromě monomerní formy proteinu (M) také jeho dimer (D) a vyšší oligomery/agregáty (A). Bylo pozorováno, že čím vyšší byla koncentrace proteinů v nanášce na GF, tím větší byl poměr agregátů ku monomerní formě. V dalších experimentech byl proto vzorek před provedením gelové filtrace zakonzentrován

vždy tak, aby koncentrace proteinů nepřesáhla 5 mg/ml. Poté byl rozdělen na alikvoty po 1 ml, které byly následně nanášeny na kolonu.



Obr. 26. Srovnání chromatogramů při různé koncentraci proteinů v nanášce. A-agregáty, D-dimer, M-monomer.

Obrázek 27 zobrazuje výsledky gelové filtrace při koncentraci proteinů v nanáše 5 mg/ml. Jednotlivé jímání frakce (obr. 27 A) byly poté analyzovány pomocí SDS elektroforézy (obr. 27 B). Na obrázku gelu získaného SDS elektroforézou za neredukujících podmínek jsou pozorovatelné proužky odpovídající monomeru proteinu mNkr-p1b LBD (15,5 kDa), jeho dimeru (31 kDa) a vyšších oligomerů. Abychom potvrdili, že se jedná skutečně o protein mNkr-p1b LBD, byla zároveň provedena i SDS elektroforéza za redukujících podmínek. Tyto výsledky dokazují pouze mírné znečištění většími proteiny v prvních frakcích. Frakce obsahující pouze monomerní formu proteinu mNkr-p1b LBD byly spojeny (frakce 7 a 8) a zakonzentrovány na požadovanou koncentraci pro NMR experimenty, která by měla být minimálně 0,2mM, což odpovídá koncentraci proteinu mNkr-p1b LBD přibližně 3 mg/ml.

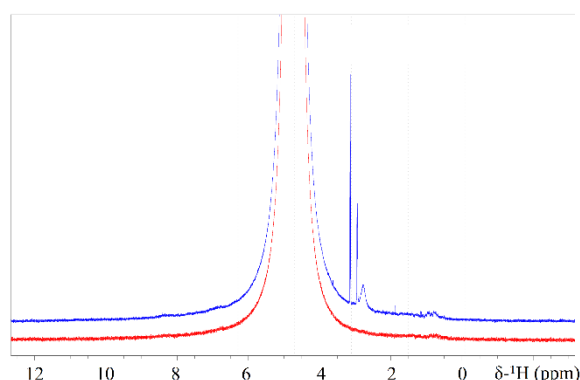


Obr. 27. Výsledky gelové filtrace (A) a analýzy získaných frakcí pomocí SDS elektroforézy (B). M-marker, čísla jednotlivých drah odpovídají číslům frakcí sbíraných při gelové filtraci. Šipkou je označen monomer proteinu mNkr-p1b LBD (15,5 kDa).

Průměrný výtěžek proteinu mNkr-p1b LBD byl 3 mg proteinu při produkci v 1 l M9 minimálního média.

5.3.3 Optimalizace stability proteinu ve vzorku

Se záměrem zjednodušení proteinových NMR spekter v závislosti na složení pufru byl pro NMR experimenty zvolen fosfátový pufr (PBS) se sníženým obsahem solí (50 mM NaCl), který neobsahuje kovalentně vázané protony produkující NMR signál interferující se signály proteinů (obr. 28). Například pufr PIPES (modrá linie v obr. 28) poskytuje několik signálů v oblasti okolo 3 ppm, které mohou se signály proteinu interferovat. Pufr PBS (červená linie) tyto signály neposkytuje.

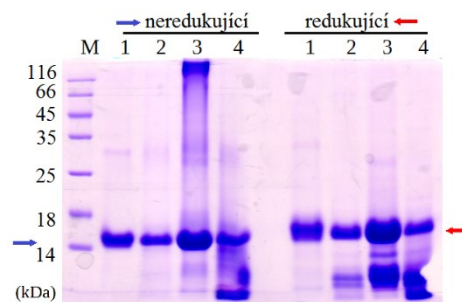


Obr. 28. Porovnání ^1H -NMR spekter proteinového vzorku *mNkr-p1b* LBD v pufru PBS (červeně znázorněném) a pufru PIPES (modře znázorněném). Velmi intenzivní signál okolo 5 ppm je signálem vody. Pro lepší porovnání je modrý signál oproti červenému posunut výše.

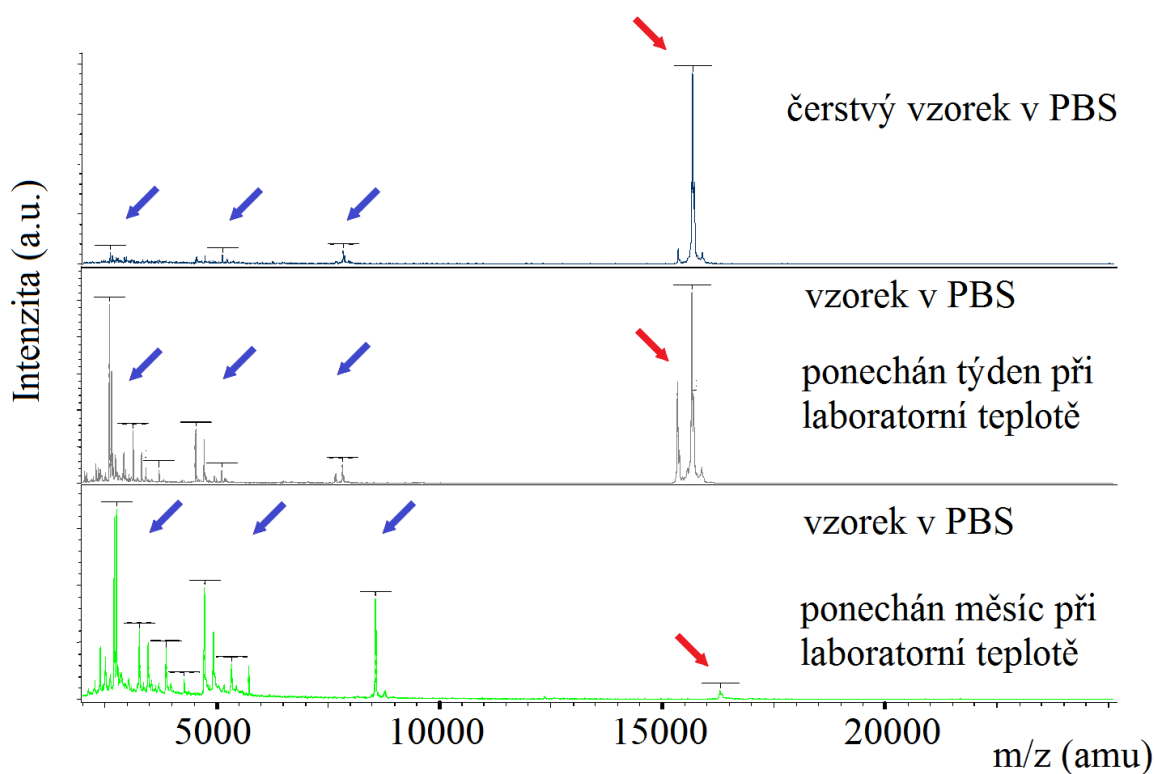
Po zahájení měření NMR spekter se bohužel ukázalo, že *mNkr-p1b* LBD není v PBS pufru při laboratorní teplotě stabilní dostatečně dlouho. Pro naměření potřebných NMR experimentů musí být protein v daném pufru stabilní po dobu minimálně 2 týdnů. Obrázek 29 (a tab. 4, str. 62) znázorňuje výsledky ověřování stability proteinu *mNkr-p1b* LBD v PBS pufru (s využitím vzorků z předchozích produkcí proteinu) s využitím SDS elektroforézy. Z výsledků vyplývá, že pokud je proteinový vzorek skladován při teplotě 4 °C, doba jeho životnosti se pohybuje v řádu měsíců. Při laboratorní teplotě však dochází k degradaci vzorku již po několika dnech. V dráze č. 3 a 4 na obrázku 29 jsou patrné proužky odpovídající rozkladným produktům proteinu - kratším peptidům, které vznikly rozpadem původního polypeptidového řetězce. Tyto výsledky byly potvrzeny i pomocí hmotnostní spektrometrie (obr. 30, str. 62) a NMR (obr. 31, str. 63) Výsledky hmotnostní spektrometrie (obr. 30, str. 62) ukazují, že postupem času dochází ke zmenšování signálu celého proteinu (okolo m/z 15 000) a nárůstu signálů značící přítomnost kratších polypeptidových řetězců (především pod m/z 5 000) vzniklých rozpadem původního proteinu. Na obrázku 31 (str. 63) je 2D- ^1H , ^{15}N -HSQC spektrum s pozorovatelnou změnou ve spektru po čtyřech dnech, kdy dochází k rozšiřování a shlukování signálů, které značí ztrátu uniformní struktury proteinu.

Tab. 4. Legenda k obr. 29.

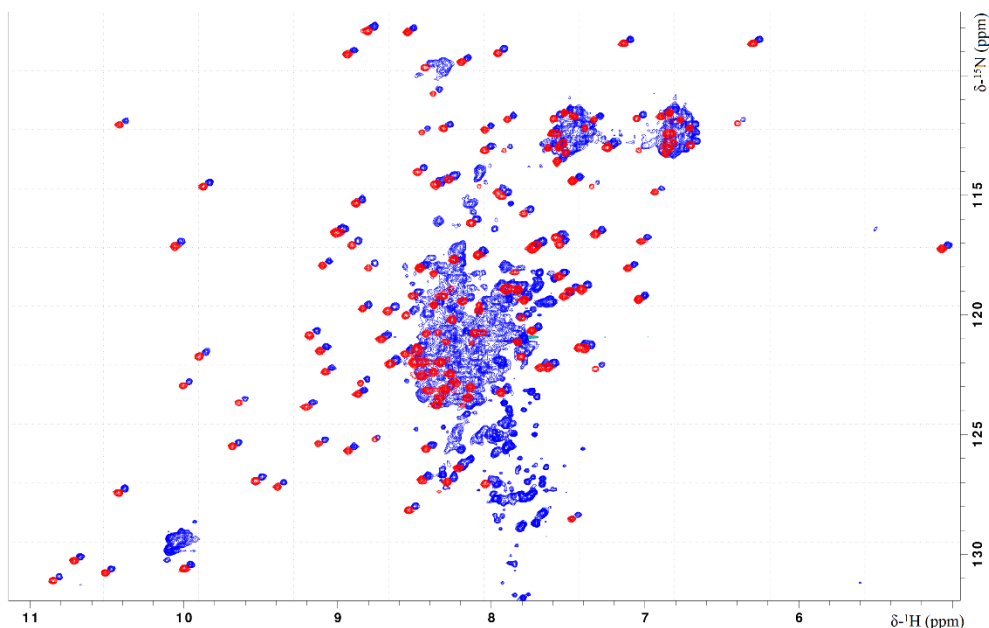
dráha	vzorky mNkr-p1b LBD
M	marker
1	skladovaný v pufru HEPES při teplotě 4 °C po dobu pěti měsíců
2	skladovaný v pufru PBS při teplotě 4°C po dobu třech měsíců
3	skladovaný v pufru PBS při teplotě 4 °C po dobu dvou měsíců a následně 14 dnů při laboratorní teplotě
4	skladovaný v pufru PBS při teplotě 4 °C po dobu jednoho měsíce a týden při laboratorní teplotě



Obr. 29. Výsledek SDS elektroforézy z ověření stability v PBS pufru (50 mM NaCl). Obsah jednotlivých drah popisuje tab. 4. Šípky označují protein mNkr-p1b LBD.

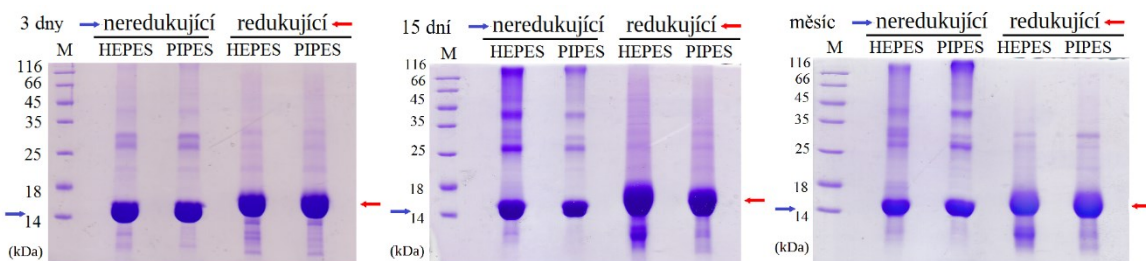


Obr. 30. Sledování stability proteinu v PBS pufru pomocí hmotnostní spektrometrie. Červené šípky značí mNkr-p1b LBD a modré značí kratší polypeptidové řetězce (rozkladné produkty). Nejedná se o jediný vzorek, ale o tři s různým datem přípravy s využitím PBS pufru.



Obr. 31. 2D- $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrum mNkr-p1b LBD. Červeně je znázorněn čerstvý vzorek v PBS pufru, modře je znázorněn identický vzorek po 4 dnech měření NMR experimentů. Spektra jsou položena přes sebe a vzájemně jsou mírně posunuta, aby bylo možné porovnat přítomné signály.

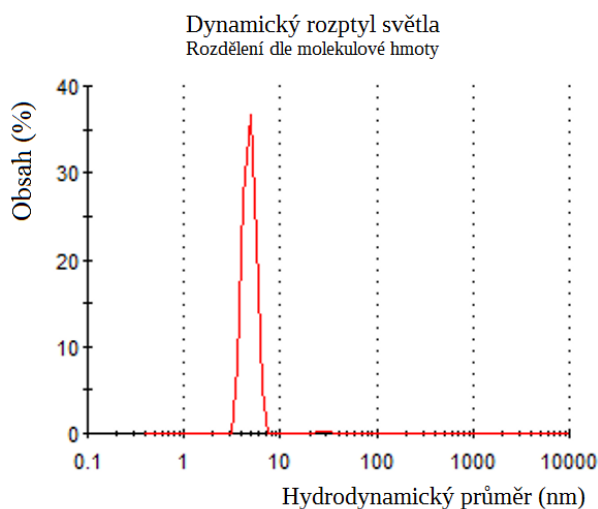
Při teplotě 4 °C sice protein mNkr-p1b LBD v pufru PBS stabilní je, ale tuto teplotu není vhodné použít při měření NMR spekter. Bylo proto nutné použít jiný pufr, ve kterém bude protein stabilní i za laboratorní teploty. Pro tyto účely byly vybrány pufrы PIPES a HEPES. Paralelně byly připraveny vzorky mNkr-p1b LBD v PIPES a v HEPES pufru, oba vzorky byly ponechány při laboratorní teplotě a jejich stabilita byla průběžně kontrolována pomocí SDS elektroforózy po dobu jednoho měsíce (obr. 32). Jelikož byl protein dostatečně stabilní v obou použitých pufrch byl pro měření NMR spekter izotopově značeného proteinu mNkr-p1b LBD zvolen pufr PIPES, který poskytuje méně NMR signálů.



Obr. 32. Výsledky SDS elektroforózy ze sledování stability proteinu mNkr-p1b LBD v HEPES a PIPES pufru. Šipky značují protein mNkr-p1b LBD (15,5 kDa).

5.4 Výsledek experimentu DLS

Ověření monodisperzity proteinového vzorku bylo provedeno metodou dynamického rozptylu světla (DLS) (obr. 33).



Obr. 33. Graf získaný analýzou výsledků experimentů dynamického rozptylu světla: procentuální obsah částic o různém hydrodynamickém průměru (rozdělení dle molekulové hmoty).

Přítomnost jediného intenzivního „peaku“ zastávajícího 99,3 % molekulové hmoty rozptylujících molekul ve vzorku a odpovídajícího hodnotě hydrodynamického průměru 4,97 nm ($\pm 0,51$ nm), což přibližně odpovídá předpokládané velikosti molekuly mNkr-p1b LBD, je potvrzením homogenity proteinového vzorku. Pomocí DLS byla také stanovena přibližná molekulová hmotnost (s využitím hydrodynamického průměru), a to 28 kDa (± 8 kDa). Tuto hodnotu lze vzhledem k nízkému počtu opakování měření a nepřesnosti dané metody v určení molekulové hmotnosti považovat za správnou a odpovídající proteinu mNkr-p1b LBD (15,5 kDa).

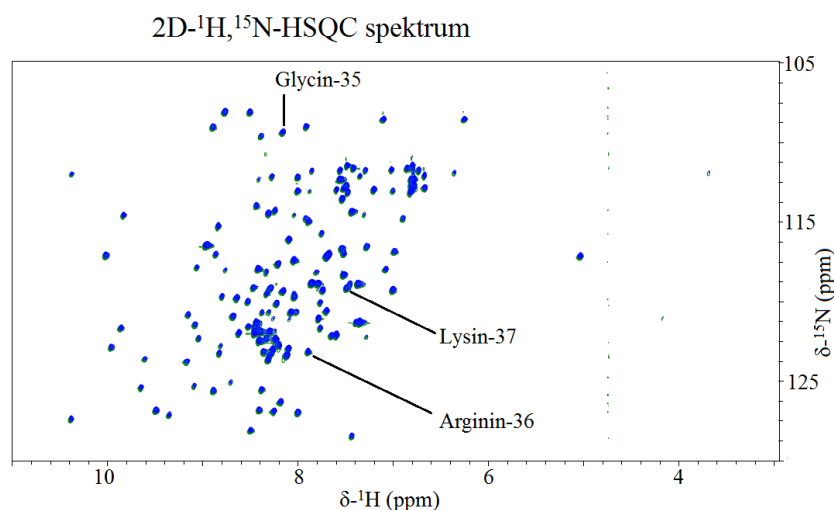
5.5 Výsledky vyhodnocení NMR spekter

S využitím softwaru Sparky (verze 3.114)¹³¹ byly ve vybraných spektrech (HSQC, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCO, HN(CA)CO) nalezeny a manuálně označeny všechny přítomné „peaky“. Prvním krokem bylo označení všech „peaků“ v 2D HSQC spektru číslem. 3D spektra využívající jádra ^1H , ^{15}N , ^{13}C si pak lze představit jako krychli obsahující „peaky“ v prostoru, z nichž každý koreluje s určitým amidovým párem (NH). Stlačením této krychle do podstavy ^1H , ^{15}N v podstatě obdržíme HSQC spektrum.

V této části výsledků jsou pro ilustraci ukázány přiřazené rezonanční frekvence jednotlivým atomům v odpovídajících spektrech. Konkrétně sekvenčně sousedících aminokyselin v proteinu mNkr-p1b LBD, a to glycinu na pozici 35, argininu-36 a lysinu-37 z celkového počtu 135 aminokyselin.

5.5.1 Výsledky ^1H , ^{15}N -HSQC experimentu

Na základě rozlišení, rozložení a intenzity jednotlivých signálů ve spektru HSQC (obr. 34) byla zhodnocena kvalita proteinového vzorku jako dostačující pro strukturní analýzu. Ve spektru HSQC byly označeny všechny signály NH dvojic. Na obrázku 35 jsou označeny signály pocházející od amidových skupin glycinu-35 (G35, $\delta(^1\text{H})=8,186$ a $\delta(^{15}\text{N})=109,3$) argininu-36 (R36, $\delta(^1\text{H})=7,921$ a $\delta(^{15}\text{N})=123,1$) a lysinu-37 (K37, $\delta(^1\text{H})=7,511$ a $\delta(^{15}\text{N})=119,0$).

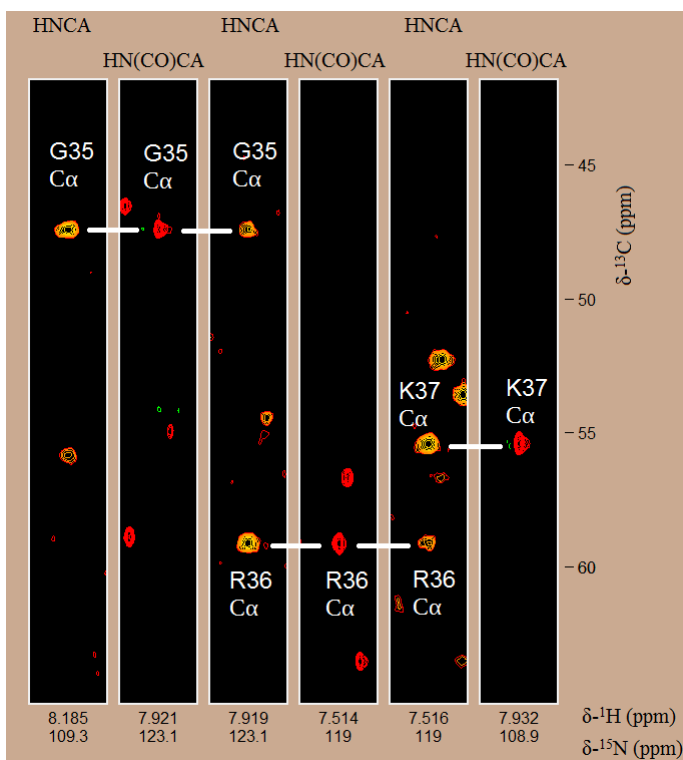


Obr. 34. 2D- ^1H , ^{15}N -HSQC spektrum mNkr-p1b LBD, vyznačeny aminokyseliny G35, R36 a K37.

5.5.2 Přiřazení signálů jednotlivým atomům

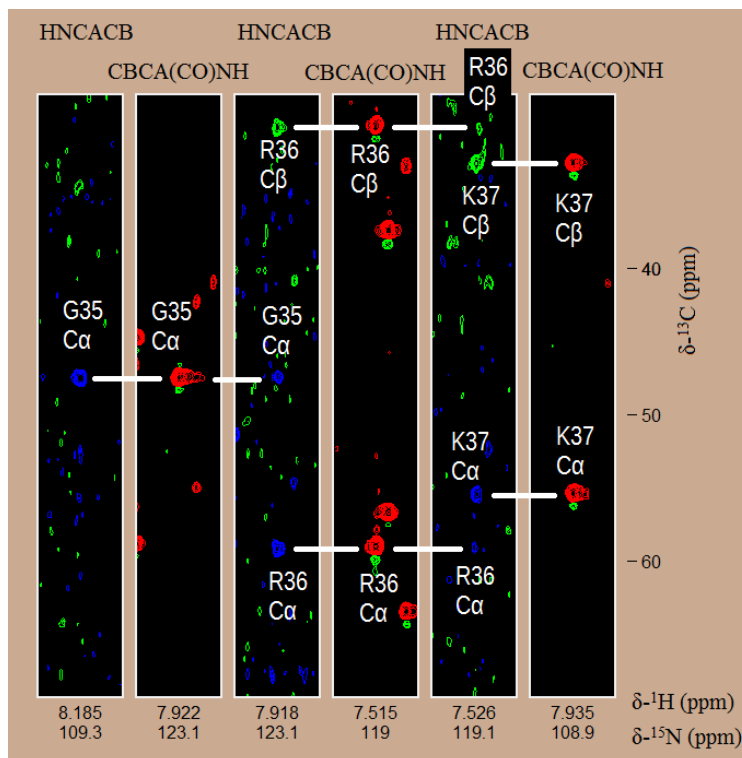
Na základě známé primární struktury proteinu mNkr-p1b a tabelovaných hodnot charakteristických chemických posunů jednotlivých atomových jader v polypeptidu, především pak chemických posunů beta uhlíků (C^β), byly jednotlivým signálům přiřazeny jim příslušející aminokyseliny v sekvenci proteinu. Program Sparky umožňuje vyhledávání signálů v okolí zvolené rezonanční frekvence v libovolném spektru, čehož je využíváno pro nalezení sousedících signálů v rámci aminokyselinové sekvence proteinu.

Pro přiřazení rezonančních frekvencí uhlíkům alfa (C^α) v polypeptidové páteři bylo využito spekter HNCA a HN(CO)CA (obr. 35). Stejnou informaci teoreticky poskytují i spektra CBCA(CO)NH a HNCACB (obr. 36, str. 67), které navíc poskytují i informaci o chemických posunech uhlíků beta (C^β), mají však nižší rozlišení, a proto je často nezbytné pracovat se všemi čtyřmi spektry současně.

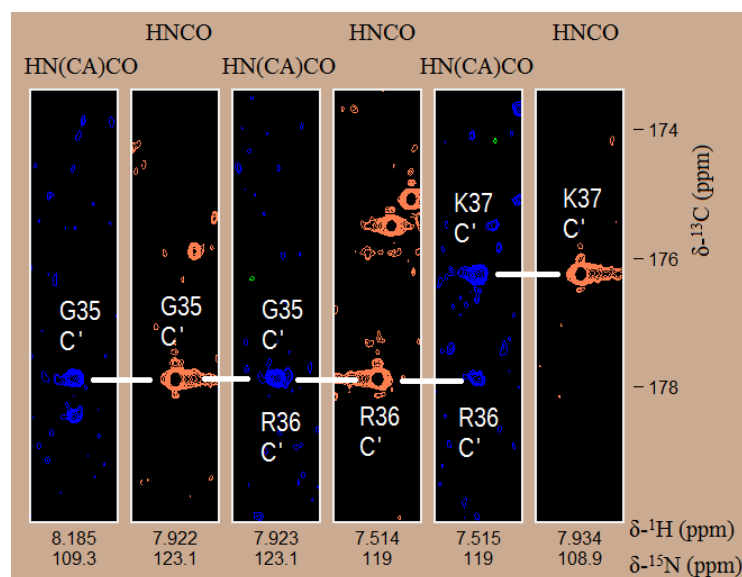


Obr. 35. Přiřazené signály alfa uhlíků (C^α) ze spekter HNCA a HN(CO)CA.

Spektra jsou však v některých oblastech špatně rozlišená a často není možné jednoznačně určit signál sousedící aminokyseliny. Ve sporných regionech je pak výhodné pro kontrolu přiřazení využít experimentů HNCO a HN(CA)CO (obr. 37), které nesou informaci o chemických posunech karbonylových uhlíků polypeptidové páteře, které závisí primárně na 3D struktuře, nikoli na typu aminokyseliny. K určení rezonančních frekvencí všech atomů proteinové páteře je tedy zapotřebí využívat souběžně tuto šestici spekter v kombinaci se spektrem HSQC. Ve sporných regionech je pak k definitivnímu rozdělení signálů zapotřebí i dalších spekter nesoucích informaci o celých postranních řetězcích aminokyselin, případně i NOESY spekter.



Obr. 36. Přiřazené signály alfa a beta uhlíků (C^α a C^β) ze spekter HNCACB a CBCA(CO)NH. U glycinu si lze všimnout, že postrádá signál pro beta uhlík.



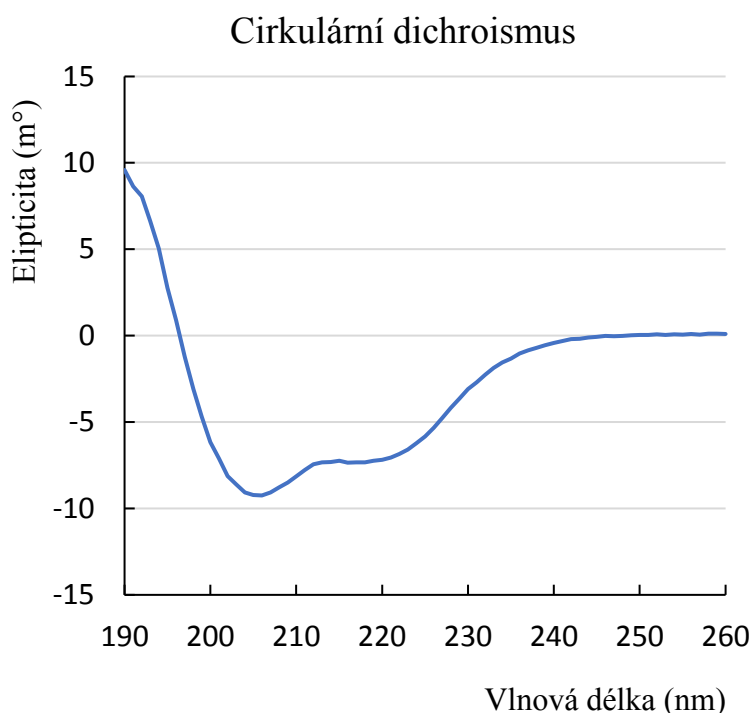
Obr. 37. Přiřazené signály karbonylových uhlíků (C') ze spekter HNC(O) a HN(CA)CO. Ve třetím pruhu lze pozorovat překryv signálů karbonylových uhlíků příslušejících glycinu a argininu.

Z celkového počtu 135 aminokyselin bylo identifikováno 97 % signálů příslušejících atomům proteinové páteře (NH, C^α, C^β, C^γ). Přiřazování signálů bylo neúspěšné u atomů aminokyselin na C-konci proteinu (H128, K129, P131, S132 a N133) a aminokyselin D15 a Q22. Důvodem je buď velký překryv signálů, zvýšená flexibilita na ms- μ s časové škále a/nebo výměna protonu z amidové skupiny proteinové páteře s protony rozpouštědla, proto jsou signály špatně rozlišitelné. (viz přílohy, str. 86).

5.6 Určení zastoupení sekundárních struktur

Pro určení zastoupení sekundárních struktur v molekule proteinu Nkr-p1b LBD byly využity tři různé metody: cirkulární dichroismus, software PSIPRED a software TALOS+.

Cirkulární dichroismus je experimentální metoda založená na měření absorpce kruhově polarizovaného záření proteinem ve vzorku (kap. 1.2.5, str. 28). Výsledky těchto měření jsou zobrazeny na obr. 38. Získané procentuální zastoupení sekundárních struktur shrnuje tab. 5. Tyto výsledky naznačují, že přibližně polovina struktury studovaného proteinu je ve formě β -skládaného listu, čtvrtinu tvoří α -helix a čtvrtinu náhodné klubko.

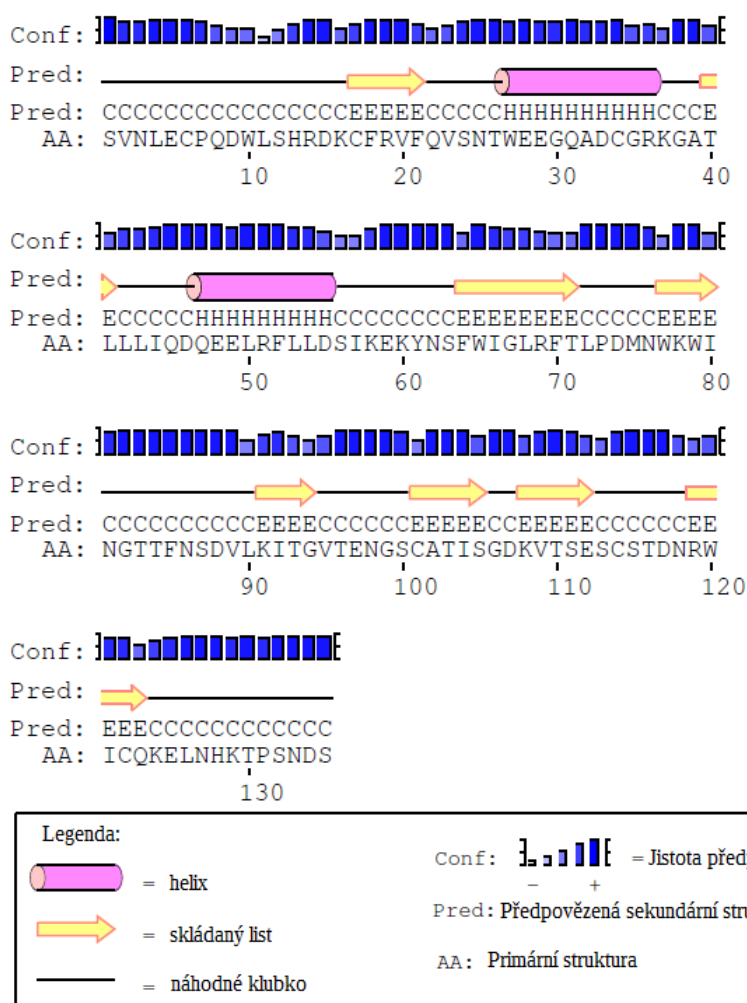


Obr. 38. Graf závislosti signálu CD (vyjádřeného v jednotkách m^2) na vlnové délce použitého kruhově polarizovaného záření.

Tab. 5. Určení zastoupení sekundárních struktur na základě CD spektra (výpočet procentuálního zastoupení byl proveden pomocí softwaru CDNN).

Sekundární struktura	Procentuální zastoupení (190-260 nm)
α -helix	21,0 %
antiparalelní β -skládaný list	25,0 %
paralelní β -skládaný list	8,4 %
náhodné klubko	45,6 %

Druhou metodou predikce sekundárních struktur, která byla v této práci použita, je software PSIPRED, který odhaduje zastoupení sekundárních struktur v proteinu pouze na základě primární struktury tohoto proteinu (aminokyselinová sekvence proteinu mNkr-p1b LBD je vypsána v kap. 4.2; obr. 14, str. 42). Na obrázku 39 je znázorněna predikce zastoupení sekundárních struktur v proteinu mNkr-p1b LBD vytvořená tímto softwarem. Touto metodou bylo určeno, že 14,1 % proteinu je ve formě α -helixu, 28,1 % ve formě β -skládaného listu a 57,8 % tvoří náhodné klubko. Toto složení poměrně dobře odpovídá obecné struktuře C-lektinové domény. Nejlépe patrné jsou dva helixy, dále by se měly zformovat dva antiparalelní β -skládané listy a smyčka (kap. 1.3.1.2, str. 30).



Obr. 39. Predikce zastoupení sekundárních struktur v proteinu mNkr-p1b LBD vytvořená softwarem PSIPRED¹³³.

Třetí metodou, která byla použita pro odhad zastoupení sekundárních struktur, byl program TALOS+ (obr. 40), který jako vstupní data využívá hodnoty chemických posunů získaných při vyhodnocování NMR spekter (viz přílohy, str. 86). Podle této metody je protein z 14,8 % tvořen α -helixem, 31,1 % tvoří β -skládaný list a 55,1 % náhodné klubko. Získané výsledky se téměř shodují s odhadem vytvořeným softwarem PSIPRED a taktéž odpovídají obecné struktuře C-lektinové domény.

SVNLECPQDW	LSHRDKCFRV	FQVSNTWEEG	QADCGRKGAT	LLLIQDQEEL	50
LLLLLLLLLLL	EELLEEEL	EELLELHHH	HHHHHLLLE	EEELLLHHH	50
0556599746	2427928998	7151178988	9998746736	3642786999	50
RFLIDS	IKEK YNSFWIGLRF	TLPDMNWKWI	NGTTFNSDVL	KITGVTEGNS	100
HHHHH	LLLL LLEEEEEEE	ELLLLLLEEL	LLLELLLLL	EELLLLLLL	100
999985	1788 8717998998	5688881615	8980428763	5410478998	100
CATISGDKV	TSESCSTDNR	WICQKELNHK	TPSNDS		135
LLLEELLE	EEEELLLLL	EEEEELLLL	LXXXLL		135
740438953	4454588766	4778974898	9---80		135

α -helix (H)	14,8 %
β -skládaný list (E)	31,1 %
náhodné klubko (L)	55,1 %
chybějící chemický posun (X)	0,02 %

Obr. 40. Zastoupení sekundárních struktur v proteinu mNkr-p1b LBD určené pomocí softwaru TALOS+ na základě chemických posunů získaných analýzou NMR spekter. V prvním řádku je uvedena aminokyselinová sekvence, druhý řádek značí typ sekundární struktury (L-náhodné klubko, E- β -skládaný list, H- α -helix, X-chybějící data) a třetí řádek značí jistotu přiřazení sekundární struktury (9 odpovídá nejvyšší jistotě).

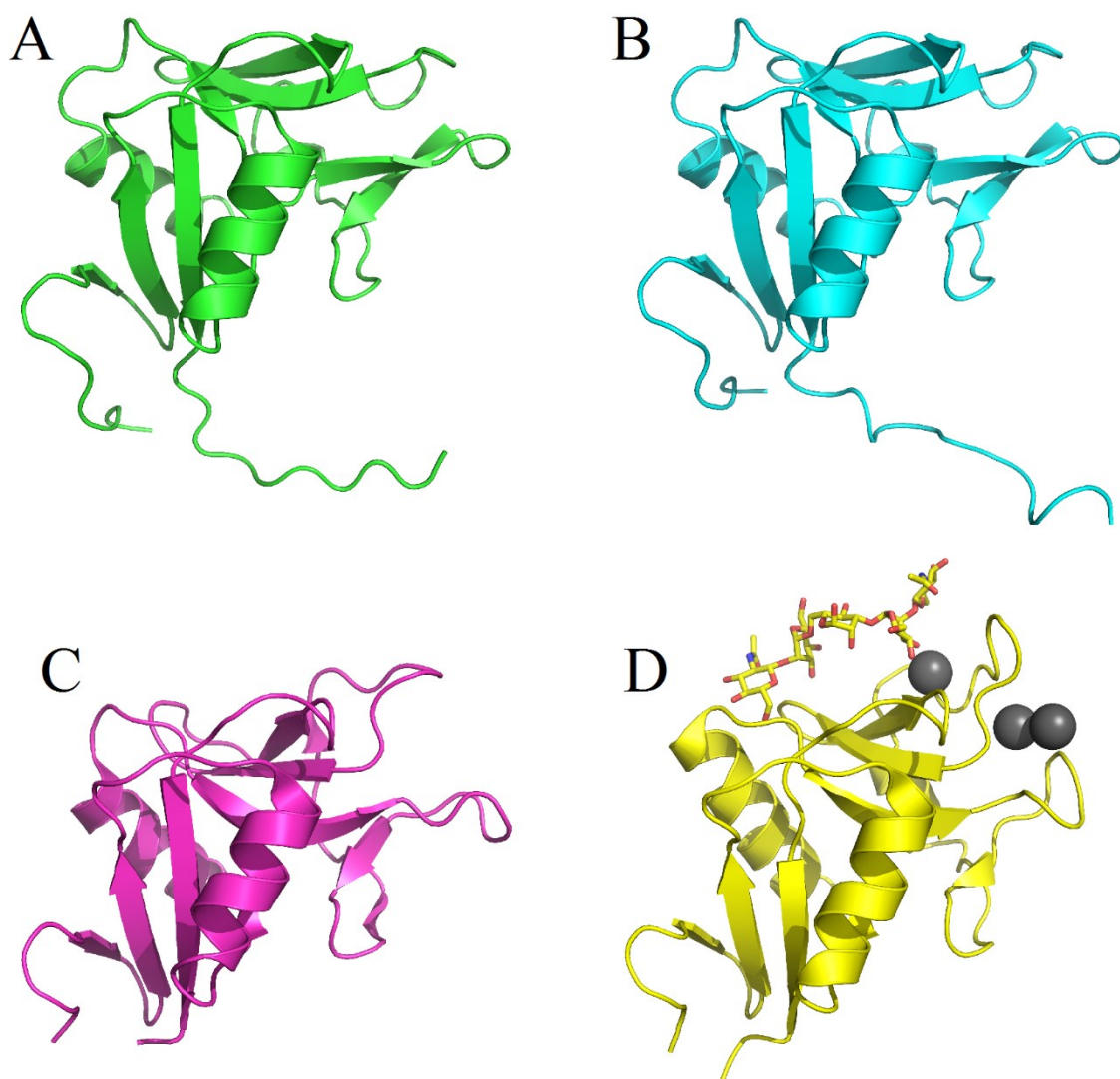
Tabulka 6 shrnuje výsledky určování zastoupení sekundárních struktur v molekule proteinu mNkr-p1b LBD získané všemi třemi metodami. Porovnáme-li procentuální zastoupení určené pomocí těchto metod, můžeme říci, že se výsledky mezi sebou víceméně shodují a celkově poměrně dobře odpovídají obecné struktuře CLTD domény, která tvoří většinu molekuly studovaného proteinu mNkr-p1b LDB.

Tab. 6. Porovnání výsledků metod predikujících zastoupení sekundárních struktur v proteinu mNkr-p1b LBD.

typ sekundární struktury	CDNN (CD)	PSIPRED (<i>in silico</i>)	TALOS (NMR)	GeNMR (NMR) (str. 72)
α -helix	21,0 %	14,1 %	14,8 %	18,5 %
β -skládaný list	33,4 %	28,1 %	31,1 %	29,6 %
náhodné klubko	45,6 %	57,8 %	55,1 %	51,9 %

5.7 Trojrozměrný model mNkr-p1b LBD

Na obrázku 41 je zobrazen model struktury proteinu mNkr-p1b LBD (obr. 41A) vytvořený softwarem GeNMR (kap. 4.10, str. 54). Pro srovnání jsou na obrázku uvedeny i struktury proteinů, které jsou studovanému Nkr-p1b strukturně nejpodobnější, a to Nkr-p1a (obr. 41B, sekvenční identita 84 %) a Clec5a (obr. 41C, 36 %). Všechny tyto tři struktury jsou velice podobné obecné struktuře CTLD domény (obr. 41D, sekvenční identita k Nkr-p1b 21 %).



Obr. 41. Model struktury proteinu mNkr-p1b LBD(A) ve srovnání se strukturou Nkr-p1a (B)¹⁴³, CLEC5A (C)¹⁴⁴ a obecnou strukturou CTLD domény (D)¹⁴⁵. Šedými kuličkami jsou v modelu CTLD domény reprezentovány vápenaté kationty a tyčinkovým modelem je znázorněn ligand GlcNAc2Man3.

6 Diskuze

Studovaná doména proteinu mNkr-p1b (ligand vazebná doména LBD) patří do superrodiny domén podobných C-lektinům (CTLD). Tato doména je zodpovědná za vazbu ligandu a aktivaci receptoru. Aktivace receptoru Nkr-p1b má v konečném důsledku inhibiční účinek na cytotoxickou aktivitu NK buněk.

K produkci proteinu mNkr-p1b LBD bylo v rámci této práce z důvodu nízké finanční a časové náročnosti využito prokaryotického expresního systému *E. coli* BL21 (DE3) transformovaného expresním vektorem pET30-a(+) obsahujícím gen pro zmíněný protein. Tento expresní systém je běžně využíván pro produkci rekombinantních proteinů pro strukturní analýzu. Jeho nevýhodou je ale nepřítomnost posttranslačních modifikací specifických pro eukaryotické organizmy. Protein mNkr-p1b LBD je protein eukaryotický a chybějící posttranslační modifikace by tudíž mohly ovlivnit jeho nativní konformaci, stabilizaci jeho terciální nebo kvartérní struktury nebo dokonce jeho ligandovou specifitu. Příprava proteinů v eukaryotických expresních systémech je sice možná, avšak v případě izotopově značených proteinů je kvůli potřebě komplexnějších živných médií mnohem nákladnější. Expres proteinů v eukaryotických buňkách je proto používána jen při studiu proteinů, o kterých se předpokládá, že pro jejich zformování do funkční struktury jsou posttranslační modifikace nezbytné. Nové poznatky také naznačují, že při expresi některých proteinů může být jejich výsledná struktura ovlivněna i rychlostí translace^{31,33}. Rychlost translace prokaryotického ribozomu je podstatně vyšší ve srovnání s eukaryotickým ribozomem (kap. 1.1.2, str. 17). Stojí proto za zmínku, že struktura některých eukaryotických proteinů produkovaných v prokaryotických expresních systémech může být též ovlivněna touto vyšší rychlostí translace.

Dalším problémem při produkci rekombinantních proteinů v prokaryotických expresních systémech je, že se proteiny poměrně často ukládají do tzv. inkluzních tělísek, která je pak nutné izolovat a v nich obsažené proteiny reverzibilně denaturovat (solubilizovat) a následně renaturovat. K renaturaci proteinu mNkr-p1b LBD bylo v této práci využito metody rychlého zředění, která byla v naší laboratoři optimalizována pro renaturaci strukturně podobných proteinů. Při dialýze, která byla v rámci metody rychlého zředění využívána k převedení proteinu z renaturačního pufru do podmínek blízkých fyziologickým, byl pozorován vznik dimeru (kap. 5.3.1, str. 58). Čím déle dialýza probíhala (tedy čím nižší koncentrace solí byla v okolí proteinu), tím vyšší byl obsah dimeru (obr. 25, str. 58).

Vzhledem k tomu, že je tvorba dimeru podporována snižováním iontové síly v roztoku, lze usuzovat, že je dimer mNkr-p1b LBD stabilizován elektrostatickými interakcemi. Vysoká koncentrace solí elektrostatické interakce narušuje a protein se pak vyskytuje v roztoku převážně ve formě monomeru.

Pro první přiblížení prostorové struktury mNkr-p1b LBD bylo v práci použito několik metod určení zastoupení sekundárních struktur (kap. 5.6, str. 69). Výsledky relativně dobře odpovídají obecné struktuře CTLD domény, kterou tvoří dva α -helixy, dva antiparalelní β -skládané listy a celá struktura je stabilizována disulfidickými můstky⁹⁹ (kap. 1.3.1.2, obr. 11, str. 30). Přítomnost disulfidických můstků byla v naší laboratoři již dříve ověřena při strukturní charakterizaci proteinu mNkr-p1b LBD pomocí hmotnostní spektrometrie¹¹⁸. Jejich přítomnost lze také částečně dokázat na základě NMR spekter, a to podle chemických posunů uhlíků C $^{\beta}$ cysteinových zbytků, které vykazují vyšší hodnoty chemických posunů odpovídající cysteinu v oxidovaném stavu (kap. 4.8.3, str. 49).

Pro určení zastoupení sekundárních struktur v proteinu mNkr-p1b LBD bylo využito metody cirkulárního dichroismu, softwaru PSIPRED a softwaru TALOS+. Předpovězené zastoupení sekundárních struktur provedené za pomoci softwarů PSIPRED a TALOS+ se liší jen nepatrně. Pomocí programu TALOS+ byly některé krátké úseky identifikovány jako součást struktur β -skládaného listu (avšak s nízkou jistotou určení) a celkově je pak procentuální zastoupení β -skládaného listu vyšší (31,1 %) než v případě programu PSIPRED (28,1 %). Výsledky cirkulárního dichroismu naznačují ještě o něco vyšší zastoupení β -skládaného listu (33,4 %). Rozdíl je i v odhadu zastoupení struktury α -helixu v molekule proteinu. Zatímco cirkulární dichroismus naznačuje 21% zastoupení α -helixu, software PSIPRED predikuje 14 % a TALOS+ 15 %. Všechny tyto výsledky si však vzhledem k nepřesnostem jednotlivých metod prakticky odpovídají. Vytvořený model struktury proteinu mNkr-p1b LBD odpovídá struktuře sekvenčně podobných proteinů, jako jsou Nkr-p1a (sekvenční identita 84 %) a clec5a (36 %), a dokonce odpovídá obecné struktuře CTLD domény, která má s Nkr-p1b jen nízkou sekvenční identitu (21 %).

Nedávno byla pomocí rentgenové krystalografie určena struktura proteinu mNkr-p1b v komplexu s proteinem m12 (PDB kód: 5TZN), ta však doposud nebyla uvolněna. Zajímavé je, že na rozdíl od proteinu Clr-b, který je přirozeným ligandem proteinu Nkr-p1b mající CTLD doménu, nese protein m12 doménu imunoglobulinového typu¹²³. Struktura určená pomocí NMR, na základě chemických posunů, v rámci předkládané práce obsahuje

extracelulární doménu receptoru mNkr-p1b bez vázaného ligandu. Další studie by se měla zaměřit na získání komplexu Nkr-p1b s jeho vazebným partnerem Clr-b pro strukturní analýzu a následné určení struktury tohoto komplexu. Zajímavé by pak bylo tento přirozený komplex porovnat s komplexem Nkr-p1b vázaného k proteinu m12, který pochází z myšího cytomegaloviru. Takové srovnání by mohlo napomoci pochopit způsob, jakým se tento virus naučil využívat strukturu interagující s receptory myších imunitních buněk.

V rámci této diplomové práce byla přiřazena aminokyselinová sekvence studovaného proteinu signálům NMR pocházejícím od polypeptidové páteře proteinu a uhlíků C^β postranních řetězců aminokyselin. Model struktury proteinu mNkr-p1b LBD, který je součástí této práce, byl pak vytvořen na základě získaných chemických posunů odečtených z NMR spekter a homologního modelování. Jedná se však zatím pouze o přibližný model a pro bližší určení terciální struktury proteinu bude dále nutné přiřadit zbývající signály pocházející od atomů postranních řetězců aminokyselin. K tomu bude v dalších fázích studia struktury proteinu Nkr-p1b LBD nutno využít NMR spektra (H)CC(CO)NH pro přiřazení alifatických uhlíkových atomů a spekter HN-TOCSY-HSQC, HCCH-TOCSY a H(CC)(CO)NH pro identifikaci atomů vodíku. Po přiřazení chemických posunů atomům vodíku, dusíku a uhlíku tvořících protein se přistoupí ke spektrům založeným na nukleárním Overhauserově efektu (NOESY spektra), které umožňují nalezení párů protonů sousedících v prostoru (do vzdálenosti cca 5 Å), aniž by byly spojené vazbou. Z intenzity příslušného signálu lze pak odhadnout jejich vzájemnou vzdálenost. Všechna získaná data budou následně využita k výpočtu možných 3D struktur proteinu mNkr-p1b LBD. Rozluštění struktury LBD domény proteinu mNkr-p1b by mohlo pomoci lépe pochopit komplexní mechanismus aktivace NK buněčné cytotoxické aktivity, a tím přispět k jejímu řízenému využití jako terapeutika proti některým virovým a nádorovým onemocněním.

7 Závěr

Výsledky získané v předkládané diplomové práci lze shrnout do následujících bodů:

- Byly optimalizovány podmínky produkce mNkr-p1b LBD v M9 minimálním médiu. Optimální koncentrace induktoru exprese je 0,4 mM, teplota produkce 37 °C a doba produkce 3 hodiny.
- Byly připraveny vzorky izotopově neznačené, jednou značené [¹⁵N] a dvakrát značené [¹³C, ¹⁵N] formy proteinu mNkr-p1b LBD o dostatečné koncentraci (c≈0,4 mM), stabilitě a homogenitě pro NMR experimenty.
- Pomocí metody dynamického rozptylu světla byla ověřena monodisperzita vzorku proteinu mNkr-p1b LBD, který je ve vzorku zastoupen z 99,3 % hmoty rozptylujících částic.
- Na základě aminokyselinové sekvence a pomocí metody cirkulárního dichroismu bylo odhadnuto zastoupení sekundárních struktur v molekule proteinu mNkr-p1b. Přibližně polovina struktury studovaného proteinu je ve formě β-skládaného listu, čtvrtinu tvoří α-helix a čtvrtinu náhodné klubko.
- Byla naměřena a vyhodnocena NMR spektra (HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCO, HN(CA)CO) pro následné určení struktury proteinu mNkr-p1b LBD.
- S využitím chemických posunů atomů proteinové páteře a známých struktur proteinů podobných mNkr-p1b LBD byl vytvořen trojrozměrný model struktury tohoto proteinu.

8 Seznam literatury

1. Kodíček, M., Valentová, O. & Hynek, R. Biochemie, chemický pohled na biologický svět. *VŠCHT Praha* (2015).
2. Voet, D. & Voet, J. G. Biochemistry, 4th Edition. *John Wiley* (2011).
3. Whitford, D. Proteins, structure and function. *John Wiley* (2005).
4. Forbes, R. M., Cooper, A. R. & Mitchell, H. H. The composition of the adult human body as determined by chemical analysis. *Nutr. Anim.* **203**, 359–366 (1953).
5. Murray, R. K. & Davis, J. C. Harper's illustrated biochemistry. 29th Edition. *McGraw-Hill Med.* (2012).
6. Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95–99 (1963).
7. Chatterjee, S., Roy, R. S. & Balaram, P. Expanding the polypeptide backbone: hydrogen-bonded conformations in hybrid polypeptides containing the higher homologues of alpha-amino acids. *J. R. Soc. Interface* **4**, 587–606 (2007).
8. Hövöller, S., Zhou, T. & Ohlson, T. Conformations of amino acids in proteins. *Acta Crystallogr. D.* **58**, 768–76 (2002).
9. Pal, D. & Chakrabarti, P. On residues in the disallowed region of the Ramachandran map. *Biopolymers* **63**, 195–206 (2002).
10. Mathews, C. K., van Holde, K. E. & Appling, D. R. Biochemistry, 4th Edition. *Pearson* (2013).
11. Lee, R. Van Der, Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., Dunker, A. K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D. T., Kim, P. M., Kriwacki, R. W., Old, C. J., Pappu, R. V., Tompa, P., Uversky, V. N., Wright, P. E. & Babu, M. M. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* **114**, 6589–6631 (2014).
12. Uversky, V. N. & Dunker, A. K. Understanding protein non-folding. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1231–1264 (2010).
13. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chem. Rev.* **104**, 3607–3622 (2004).
14. Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F. & Jones, D. T. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J. Mol. Biol.* **337**, 635–645 (2004).
15. Fink, A. L. Natively unfolded proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 35–41 (2005).
16. Dunker, A. K., Silman, I., Uversky, V. N. & Sussman, J. L. Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 756–764 (2008).
17. Anfinsen, C. B. & Haber, E. Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **236**, 1361–1363 (1961).
18. Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223–230 (1973).

19. Lumry, R., Biltonen, R. & Brandts, J. F. Validity of the ‘two-state’ hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* **4**, 917–944 (1966).
20. Zwanzig, R., Szabo, A. & Bagchi, B. Levinthal’s paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 20–2 (1992).
21. Baldwin, R. L. Protein folding from 1961 to 1982. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 814–817 (1999).
22. Levinthal, C. Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys. P. C. B.* **65**, 44–45 (1968).
23. Widom, B. & Bhimalapuram, P. The hydrophobic effect. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5**, 3085–3093 (2003).
24. Baldwin, R. L. Energetics of protein folding kinetics. *J. Mol. Biol.* **371**, 283–301 (2007).
25. Dill, K. a & Chan, H. S. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 10–19 (1997).
26. Tsytlonok, M. & Itzhaki, L. S. The how’s and why’s of protein folding intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* **531**, 14–23 (2013).
27. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2 Å. *Science* **289**, 905–920 (2000).
28. Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., Bukau, B., Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N. & Bukau, B. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* **16**, 589–597 (2009).
29. Zhang, G. & Ignatova, Z. Folding at the birth of the nascent chain: Coordinating translation with co-translational folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 25–31 (2011).
30. Varenne, S., Buc, J., Lloubes, R. & Lazdunski, C. Translation is a non-uniform process. *J. Mol. Biol.* **180**, 549–576 (1984).
31. Tsai, C., Sauna, Z. E., Kimchi-sarfaty, C., Ambudkar, S. V, Gottesman, M. & Nussinov, R. Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. *Hum. Genet.* **383**, 281–291 (2009).
32. Sharma, A. K., Bukau, B. & O’Brien, E. P. Physical origins of codon positions that strongly influence cotranslational folding: A framework for controlling nascent-protein folding. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1180–1195 (2016).
33. Buhr, F., Jha, S., Thommen, M., Mittelstaet, J., Kutz, F., Schwalbe, H., Rodnina, M. V. & Komar, A. A. Synonymous codons direct cotranslational folding toward different protein conformations. *Mol. Cell* **61**, 341–351 (2016).
34. Ellis, R. Proteins as molecular chaperones. *Nature* **328**, 378–379 (1987).
35. Lindquist, S. & Craig, E. A. The heat -shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631–77 (1988).
36. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 1–17 (2014).

37. Broadway, N. Recombinant protein expression: Vector-host systems. *Mater. Methods* **2**, 10–14 (2012).
38. Bernhard, F. & Tozawa, Y. Cell-free expression-making a mark. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 374–380 (2013).
39. Studier, W. F. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130 (1986).
40. Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S. & Kim, J. F. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.* **394**, 634–643 (2009).
41. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M. & Panda, A. K. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb. Cell Fact.* **14**, 1–10 (2015).
42. Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. & Arakawa, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* **28**, 1–8 (2003).
43. Bourne, P. E. & Weissig, H. Structural bioinformatics. *Wiley-Liss* (2003).
44. RCSB PDB.
http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html
(poslední přístup 2. 3. 2017).
45. Hardin, C., Pogorelov, T. V. & Luthey-Schulten, Z. Ab initio protein structure prediction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 176–181 (2002).
46. Marks, D. S., Hopf, T. a, Chris, S. & Sander, C. Protein structure prediction from sequence variation. *Nat. Biotechnol.* **30**, 1072–1080 (2012).
47. Rohl, C. A., Strauss, C. E. M., Misura, K. M. S. & Baker, D. Protein structure prediction using Rosetta. *Method. Enzym.* **383**, 66–93 (2004).
48. Liam J. McGuffin, Bryson, K. & Jones, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404–405 (2000).
49. Brändén, C.-I. & Jones, T. A. Between objectivity and subjectivity. *Nature* **343**, 687–689 (1990).
50. Bragg, W. L. The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **89**, 248–277 (1913).
51. Rosenbaum, G., Holmes, K. C. & Witz, J. Synchrotron radiation as a source for X-ray diffraction. *Nature* **230**, 434–437 (1971).
52. Hendrickson, W. Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* **254**, 51–58 (1991).
53. Engh, R. A. & Huber, R. Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr. Sect. A* **47**, 392–400 (1991).
54. Brunger, A. T. & Adams, P. D. Molecular dynamics applied to X-ray structure refinement. *Acc. Chem. Res.* **35**, 404–412 (2002).
55. Shi, D., Nannenga, B. L., Iadanza, M. G. & Gonen, T. Three-dimensional electron crystallography of protein microcrystals. *Elife* **2**, (2013).

56. Ruska, E. The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Biosci. Rep.* **7**, 607–629 (1987).
57. Kühlbrandt, W. Cryo-EM enters a new era. *Elife* **3**, 1–4 (2014).
58. Bartesaghi, A., Merk, A., Banerjee, S., Matthies, D., Wu, X., Milne, J. L. S. & Subramaniam, S. 2.2 Å resolution cryo-EM structure of β -galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor. *Science* **348**, 1147–1152 (2015).
59. Trabuco, L. G., Villa, E., Mitra, K., Frank, J. & Schulten, K. Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *Structure* **16**, 673–83 (2008).
60. Frank, J. Advances in the field of single-particle cryo-electron microscopy over the last decade. *Nat. Protoc.* **12**, 209–212 (2017).
61. Zeeman, P. Doublets and triplets in the spectrum produced by external magnetic forces. *Phil. Mag.* **44**, 55–60 (1897).
62. Purcell, E. M. Research in nuclear magnetism. *Science* **118**, 431–436 (1953).
63. Ernst, R. R. Nuclear magnetic resonance Fourier transform spectroscopy. *Biosci. Rep.* **12**, 143–187 (1992).
64. Wüthrich, K. The second decade - into the third millennium. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 492–495 (1998).
65. Paliy, O. & Gunasekera, T. S. Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1169–1172 (2007).
66. Gardner, K. H. & Kay, L. E. The use of ^2H , ^{13}C , ^{15}N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 357–406 (1998).
67. Doucleff, M., Hatcher-Skeers, M. & Crane, N. J. Pocket guide to biomolecular NMR. *Springer* (2011).
68. NMR Structural Biology Facility. <http://structuralbiology.uchc.edu/faq/> (poslední přístup 2. 3. 2017).
69. Wagner, G. Prospects for NMR of large proteins. *J. Biomol. NMR* **3**, 375–385 (1993).
70. List of NMR isotopes - PyPulsar. http://www-lcs.ensicaen.fr/pyPulsar/index.php/List_of_NMR_isotopes (poslední přístup 1. 3. 2017).
71. Bax, A. & Grzesiek, S. Methodological advances in protein NMR. *Acc. Chem. Res.* **26**, 131–138 (1993).
72. Clubb, R. T., Thanabal, V. & Wagner, G. A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue ^1H N, ^{15}N , and ^{13}C chemical shifts in ^{15}N - ^{13}C -labelled proteins. *J. Magn. Reson.* **97**, 213–217 (1992).
73. Markley, J. L., Putter, I. & Jardetzky, O. High-resolution nuclear magnetic resonance spectra of selectively deuterated staphylococcal nuclease. *Science* **161**, 1249–1251 (1968).

74. Kumar, A., Ernst, R. R. & Wüthrich, K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1–6 (1980).
75. Grzesiek, S. & Bax, A. An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. *J. Magn. Reson.* **99**, 201–207 (1992).
76. Wüthrich, K. NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture). *J. Biomol. NMR* **27**, 13–39 (2003).
77. Nilges, M. Structure calculation from NMR data. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 617–623 (1996).
78. Andrew, E. R., Bradbury, A. & Eades, R. G. Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature* **183**, 1802–1803 (1959).
79. Zhou, D. H., Shea, J. J., Nieuwkoop, A. J., Franks, W. T., Wylie, B. J., Mullen, C., Sandoz, D. & Rienstra, C. M. Solid-state protein-structure determination with proton-detected triple-resonance 3D magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 8380–8383 (2007).
80. Griffin, R. G. Dipolar recoupling in MAS spectra of biological solids. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 508–512 (1998).
81. Marassi, F. M. & Opella, S. J. A solid-state NMR index of helical membrane protein structure and topology. *J. Magn. Reson.* **144**, 150–5 (2000).
82. Castellani, F., van Rossum, B., Diehl, A., Schubert, M., Rehbein, K. & Oschkinat, H. Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Nature* **420**, 98–102 (2002).
83. Manolikas, T., Herrmann, T. & Meier, B. H. Protein structure determination from ¹³C spin-diffusion solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3959–3966 (2008).
84. Hartmann, S. R. & Hahn, E. L. Nuclear double resonance in the rotating frame. *Phys. Rev.* **128**, 2042–2053 (1962).
85. Berne, B. J. & Pecora, R. Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics. *Dover Publications* (2000).
86. Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H. & Kern, D. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **40**, 372–382 (2012).
87. Greenfield, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* **1**, 2876–2890 (2006).
88. Vivier, E. What is natural in natural killer cells? *Immunol. Lett.* **107**, 1–7 (2006).
89. Lanier, L. L. Nk cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225–274 (2004).
90. Vély, F. & Vivier, E. Natural killer cell receptor signaling pathway. *Sci. STKE* **2005**, 8–11 (2005).

91. Lanier, L. Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**, 495–502 (2008).
92. Bork, P., Holm, L. & Sander, C. The immunoglobulin fold: Structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.* **242**, 309–20 (1994).
93. 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).
94. 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).
95. 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).
96. Goldstein, I. J., Hughes, C. R., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. What should be called a lectin? *Nature* **285**, 66 (1980).
97. Drickamer, K. Ca(2+) dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 393–400 (1993).
98. Kumar, Kk., Reddy, Gs., Reddy, B., Shekar, Pc., Sumanthi, J. & Chandra, Kl. P. Biological role of lectins. *J. Orofac. Sci.* **4**, 20 (2012).
99. Zelensky, A. N. & Gready, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* **272**, 6179–6217 (2005).
100. Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R. A. & Margulies, D. H. Structure and function of natural killer cell receptors: Multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 853–885 (2002).
101. Sano, H., Kuroki, Y., Honma, T., Ogasawara, Y., Sohma, H., Voelker, D. R. & Akino, T. Analysis of chimeric proteins identifies the regions in the carbohydrate recognition domains of rat lung collectins that are essential for interactions with phospholipids, glycolipids, and alveolar type II cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 4783–4789 (1998).
102. Geider, S., Baronnet, A., Cerini, C., Nitsche, S., Astier, J. P., Michel, R., Boistelle, R., Berland, Y., Dagorn, J. C. & Verdier, J. M. Pancreatic lithostathine as a calcite habit modifier. *J. Biol. Chem.* **271**, 26302–26306 (1996).
103. Weiss, I. M., Kaufmann, S., Mann, K. & Fritz, M. Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 17–21 (2000).
104. Yokoyama, W. M. Natural killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 298–305 (1998).
105. Matsumoto, N., Ribaldo, R. K., Abastado, J. P., Margulies, D. H. & Yokoyama, W. M. The lectin-like NK cell receptor Ly-49A recognizes a carbohydrate- independent epitope on its MHC class I ligand. *Immunity* **8**, 245–254 (1998).
106. Weis, W. I., Taylor, M. E. & Drickamer, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* **163**, 19–34 (1998).

107. 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**, 1–10 (2013).
108. Plougastel, B., Dubbelde, C. & Yokoyama, W. M. Cloning of Clr, a new family of lectin-like genes localized between mouse Nkrp1a and Cd69. *Immunogenetics* **53**, 209–214 (2001).
109. Iizuka, K., Naidenko, O. V, Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H. & Yokoyama, W. M. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors. *Nat. Immunol.* **4**, 801–807 (2003).
110. Carlyle, J. R., Mesci, A., Fine, J. H., Chen, P., Bélanger, S., Tai, L. H. & Makrigiannis, A. P. Evolution of the Ly49 and Nkrp1 recognition systems. *Semin. Immunol.* **20**, 321–330 (2008).
111. Kveberg, L., Sudworth, A., Todros-Dawda, I., Inngjerdingen, M. & Vaage, J. T. Functional characterization of a conserved pair of NKR-P1 receptors expressed by NK cells and T lymphocytes in liver and gut. *Eur. J. Immunol.* **45**, 501–512 (2015).
112. Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsharif, M., Mathew, P. A., Warren, H. S. & Lanier, L. L. Cutting edge: Lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J. Immunol.* **175**, 7796–9 (2005).
113. 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).
114. Carlyle, J. R., Mesci, A., Ljutic, B., Belanger, S., Tai, L.-H., Rousselle, E., Troke, A. D., Proteau, M.-F. & Makrigiannis, A. P. Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1 alloreactivity of mouse NK cells. *J Immunol* **176**, 7511–7524 (2006).
115. Chen, P., Bélanger, S., Aguilar, O. A., Zhang, Q., St.-Laurent, A., Rahim, M. M. A., Makrigiannis, A. P. & Carlyle, J. R. 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).
116. Carlyle, J. R., Martin, A., Mehra, A., Attisano, L., Tsui, F. W. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function. *J. Immunol.* **162**, 5917–23 (1999).
117. Ljutic, B., Carlyle, J. R., Filipp, D., Nakagawa, R., Julius, M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Functional requirements for signaling through the stimulatory and inhibitory mouse NKR-P1 (CD161) NK cell receptors. *J. Immunol.* **174**, 4789–4796 (2005).
118. Hernychová, L., Mrázek, H., Ivanova, L., Kukačka, Z., Chmelík, J. & Novák, P. Recombinant expression, in vitro refolding and characterizing disulfide bonds of a mouse inhibitory C-type lectin-like receptor Nkrp1b. *Physiol. Res.* **64**, S85–S93 (2015).

119. Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, C. S., Arase, H. & Raulet, D. H. Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3527–3532 (2004).
120. Zhang, Q., Rahim, M. M. A., Allan, D. S. J., Tu, M. M., Belanger, S., Abou-Samra, E., Ma, J., Sekhon, H. S., Fairhead, T., Zein, H. S., Carlyle, J. R., Anderson, S. K. & Makrigiannis, A. P. Mouse Nkrp1-Clr gene cluster sequence and expression analyses reveal conservation of tissue-specific MHC-independent immunosurveillance. *PLoS One* **7**, 1–19 (2012).
121. Voigt, S., Mesci, A., Ettinger, J., Fine, J. H., Chen, P., Chou, W. & Carlyle, J. R. Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKR-P1B:Clr-b missing-self axis. *Immunity* **26**, 617–627 (2007).
122. Williams, K. J. N., Wilson, E., Davidson, C. L., Aguilar, O. A., Fu, L., Carlyle, J. R. & Burshtyn, D. N. Poxvirus infection-associated downregulation of C-type lectin-related-b prevents NK cell inhibition by NK receptor protein-1B. *J. Immunol.* **188**, 4980–4991 (2012).
123. Aguilar, O. A., Berry, R., Rahim, M. M. A., Reichel, J. J., Popović, B., Tanaka, M., Fu, Z., Balaji, G. R., Lau, T. N. H., Tu, M. M., Kirkham, C. L., Mahmoud, A. B., Mesci, A., Krmpotić, A., Allan, D. S. J., Makrigiannis, A. P., Jonjić, S., Rossjohn, J. & Carlyle, J. R. A viral immunoevasin controls innate immunity by targeting the prototypical natural killer cell receptor family. *Cell* **169**, 58–71 (2017).
124. Hernychová, L. Studium interakce lektinových receptorů přirozených zabíječů s jejich proteinovými ligandy. *Diplomová práce. PřF UK* (2014).
125. Reynolds, J. A. & Tanford, C. The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* **245**, 5161–5165 (1970).
126. Switzer, R. C., Merril, C. R. & Shifrin, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **98**, 231–237 (1979).
127. Rabilloud, T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: A 10-year synthesis. *Electrophoresis* **11**, 785–794 (1990).
128. Francis, D. M. & Page, R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *John Wiley* (2010).
129. Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Lan, W., Wang, J., Wu, H., Cao, C. & Wang, X. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS One* **6**, 1–8 (2011).
130. Protein purification chromatography: ENrich™ high-resolution protein purification columns. *Bio-Rad* (2013).
131. Sparky - NMR Assignment Program. <https://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/> (poslední přístup 15. 4. 2017).
132. Böhm, G., Muhr, R. & Jaenicke, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* **5**, 191–195 (1992).
133. PSIPRED. <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> (poslední přístup 16. 4. 2017).

134. Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G. & Bax, A. TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. NMR* **44**, 213–223 (2009).
135. Berjanskii, M., Tang, P., Liang, J., Cruz, J. A., Zhou, J., Zhou, Y., Bassett, E., MacDonell, C., Lu, P., Lin, G. & Wishart, D. S. GeNMR: A web server for rapid NMR-based protein structure determination. *Nucleic Acids Res.* **37**, 670–677 (2009).
136. Alfa img. <http://alfa-img.com/show/triple-helix-hydrogen-bonding-in.html> (poslední přístup 4. 4. 2017).
137. Karplus, M. Behind the folding funnel diagram. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 401–404 (2011).
138. Principles of NMR. <http://www.process-nmr.com/nmr1.htm> (poslední přístup 4. 4. 2017).
139. Scheme. https://www.researchgate.net/figure/8897777_fig22_Fig-24-Scheme-indicating-the-relations-between-an-experimental-2D-1-H-1-H-NOESY (poslední přístup 12. 4. 2017).
140. Sarkar, R., Rodriguez Camargo, D. C., Pintacuda, G. & Reif, B. Restoring resolution in biological solid-state NMR under conditions of off-magic-angle spinning. *J. Phys. Chem. Lett.* **6**, 5040–5044 (2015).
141. CD fit. http://srcd_fit5.nsrcc.org.tw/ (poslední přístup 27. 3. 2017).
142. Protein NMR: A practical guide. <http://www.protein-nmr.org.uk/> (poslední přístup 26. 3. 2017).
143. Rozbeský, D., Adámek, D., Pospíšilová, E., Novák, P. & Chmelík, J. Solution structure of the lymphocyte receptor Nkrp1a reveals a distinct conformation of the long loop region as compared to in the crystal structure. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **84**, 1304–1311 (2016).
144. Watson, A. A., Lebedev, A. A., Hall, B. A., Fenton-May, A. E., Vagin, A. A., Dejnirattisai, W., Felce, J., Mongkolsapaya, J., Palma, A. S., Liu, Y., Feizi, T., Screaton, G. R., Murshudov, G. N. & O’Callaghan, C. A. Structural flexibility of the macrophage dengue virus receptor CLEC5A: Implications for ligand binding and signaling. *J. Biol. Chem.* **286**, 24208–24218 (2011).
145. Feinberg, H., Mitchell, D. a, Drickamer, K. & Weis, W. I. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* **294**, 2163–6 (2001).

9 Přílohy

Tabulka chemických posunů jader získaných z NMR spekter:

skupina	atom	chem. posun (ppm)	odchylka	skupina	atom	chem. posun (ppm)	odchylka
S1	C	174.706	0.027	H13	C	173.715	0.012
S1	CA	58.268	0.060	H13	CA	57.142	0.046
S1	CB	63.945	0.087	H13	CB	32.207	0.115
S1	H	8.228	0.002	H13	H	8.405	0.003
S1	N	121.604	0.030	H13	N	122.910	0.036
V2	C	175.449	0.022	R14	C	175.279	0.000
V2	CA	62.059	0.067	R14	CA	58.361	0.029
V2	CB	32.858	0.041	R14	CB	27.522	0.000
V2	H	8.078	0.005	R14	H	8.734	0.006
V2	N	120.934	0.082	R14	N	125.140	0.054
N3	C	174.706	0.005	K16	C	174.853	0.011
N3	CA	53.071	0.045	K16	CA	55.365	0.038
N3	CB	39.091	0.085	K16	CB	36.845	0.047
N3	H	8.463	0.005	K16	H	8.254	0.003
N3	N	122.291	0.046	K16	N	118.960	0.039
L4	C	176.309	0.004	C17	C	174.879	0.006
L4	CA	55.118	0.112	C17	CA	52.748	0.042
L4	CB	42.536	0.045	C17	CB	42.953	0.105
L4	H	8.274	0.007	C17	H	8.625	0.004
L4	N	123.236	0.072	C17	N	119.611	0.049
E5	C	176.067	0.007	F18	C	173.436	0.002
E5	CA	55.495	0.064	F18	CA	56.364	0.234
E5	CB	31.717	0.040	F18	CB	43.161	0.054
E5	H	8.040	0.004	F18	H	9.860	0.003
E5	N	119.726	0.051	F18	N	121.562	0.019
C6	C	172.211	0.000	R19	C	172.461	0.006
C6	CA	52.731	0.007	R19	CA	55.770	0.044
C6	CB	37.909	0.000	R19	CB	31.166	0.080
C6	H	8.496	0.004	R19	H	8.166	0.004
C6	N	119.805	0.022	R19	N	119.334	0.011
P7	C	175.779	0.005	V20	C	175.290	0.006
P7	CA	62.214	0.030	V20	CA	61.710	0.043
P7	CB	31.201	0.000	V20	CB	32.049	0.038
Q8	C	176.669	0.010	V20	H	8.232	0.003
Q8	CA	57.927	0.093	V20	N	126.793	0.009
Q8	CB	28.755	0.036	F21	C	174.990	0.000
Q8	H	8.379	0.003	F21	CA	59.240	0.017
Q8	N	120.580	0.024	F21	CB	40.675	0.000
D9	C	175.336	0.012	F21	H	8.177	0.003
D9	CA	56.626	0.063	F21	N	126.195	0.039
D9	CB	38.904	0.000	V23	C	173.458	0.004
D9	H	8.868	0.003	V23	CA	61.377	0.064
D9	N	116.861	0.032	V23	CB	33.017	0.077
10A	H	6.806	0.000	V23	H	7.007	0.002
10A	N	112.744	0.000	V23	N	119.043	0.036
W10	C	175.398	0.009	S24	C	174.041	0.005
W10	CA	57.301	0.030	S24	CA	56.335	0.096
W10	CB	28.681	0.036	S24	CB	64.380	0.064
W10	H	8.230	0.002	S24	H	8.187	0.002
W10	N	120.099	0.017	S24	N	117.425	0.046
L11	C	176.153	0.002	N25	C	175.170	0.005
L11	CA	54.338	0.054	N25	CA	52.803	0.039
L11	CB	43.612	0.021	N25	CB	41.655	0.032
L11	H	9.180	0.007	N25	H	9.649	0.003
L11	N	123.633	0.022	N25	N	125.242	0.021
S12	C	174.620	0.015	T26	C	174.353	0.005
S12	CA	56.900	0.123	T26	CA	62.078	0.090
S12	CB	65.805	0.042	T26	CB	70.897	0.062
S12	H	8.341	0.004	T26	H	9.838	0.002
S12	N	114.517	0.028	T26	N	114.490	0.024

skupina	atom	chem. posun (ppm)	odchylka
W27	C	177.622	0.006
W27	CA	62.311	0.056
W27	CB	29.828	0.328
W27	H	7.660	0.003
W27	N	122.074	0.018
E28	C	180.009	0.008
E28	CA	59.809	0.073
E28	CB	29.425	0.065
E28	H	8.840	0.003
E28	N	115.143	0.021
E29	C	178.628	0.002
E29	CA	58.229	0.037
E29	CB	27.896	0.020
E29	H	7.396	0.002
E29	N	121.155	0.023
G30	C	173.678	0.004
G30	CA	45.797	0.039
G30	H	8.011	0.002
G30	N	112.837	0.027
Q31	C	178.963	0.005
Q31	CA	58.608	0.029
Q31	CB	27.226	0.030
Q31	H	7.702	0.002
Q31	N	120.530	0.021
A32	C	180.122	0.003
A32	CA	54.500	0.038
A32	CB	17.860	0.025
A32	H	7.610	0.001
A32	N	122.031	0.014
D33	C	178.576	0.002
D33	CA	58.349	0.063
D33	CB	43.026	0.071
D33	H	8.090	0.002
D33	N	120.589	0.026
C34	C	178.376	0.007
C34	CA	56.055	0.059
C34	CB	34.448	0.031
C34	H	8.251	0.002
C34	N	114.235	0.045
G35	C	177.782	0.006
G35	CA	47.670	0.025
G35	H	8.186	0.002
G35	N	109.313	0.019
R36	C	177.779	0.004
R36	CA	59.343	0.054
R36	CB	30.534	0.091
R36	H	7.921	0.002
R36	N	123.090	0.014
K37	C	176.155	0.005
K37	CA	55.652	0.056
K37	CB	33.015	0.042
K37	H	7.516	0.005
K37	N	119.043	0.020
G38	C	174.179	0.015
G38	CA	46.800	0.062
G38	H	7.934	0.002
G38	N	108.884	0.024
A39	C	175.228	0.006
A39	CA	50.359	0.078
A39	CB	24.341	0.025
A39	H	8.129	0.002

skupina	atom	chem. posun (ppm)	odchylka
A39	N	123.340	0.027
T40	C	174.761	0.033
T40	CA	59.942	0.114
T40	CB	73.439	0.129
T40	H	8.770	0.002
T40	N	107.988	0.033
L41	C	177.455	0.011
L41	CA	56.619	0.085
L41	CB	44.167	0.204
L41	H	8.458	0.009
L41	N	121.868	0.138
L42	C	174.753	0.030
L42	CA	56.684	0.068
L42	CB	44.544	0.033
L42	H	7.807	0.004
L42	N	118.061	0.016
L43	C	175.486	0.804
L43	CA	53.705	0.040
L43	CB	43.058	0.026
L43	H	8.017	0.005
L43	N	127.011	0.016
I44	C	175.779	0.002
I44	CA	59.929	0.066
I44	CB	39.105	0.020
I44	H	5.055	0.005
I44	N	117.250	0.009
Q45	C	175.500	0.006
Q45	CA	57.999	0.843
Q45	CB	30.794	0.008
Q45	H	9.506	0.003
Q45	N	126.745	0.030
D46	C	175.110	0.004
D46	CA	53.056	0.082
D46	CB	41.952	0.046
D46	H	7.233	0.002
D46	N	112.914	0.014
Q47	C	177.675	0.005
Q47	CA	58.810	0.095
Q47	CB	28.536	0.060
Q47	H	8.767	0.002
Q47	N	117.832	0.021
E48	C	179.083	0.004
E48	CA	59.841	0.045
E48	CB	28.657	0.054
E48	H	8.294	0.002
E48	N	121.901	0.020
E49	C	177.857	0.005
E49	CA	59.835	0.029
E49	CB	30.148	0.048
E49	H	8.446	0.002
E49	N	121.670	0.016
L50	C	177.176	0.001
L50	CA	58.394	0.027
L50	CB	41.500	0.020
L50	H	7.518	0.003
L50	N	118.201	0.018
R51	C	178.046	0.009
R51	CA	59.401	0.052
R51	CB	29.958	0.038
R51	H	8.062	0.002
R51	N	117.404	0.018

skupina	atom	chem. posun (ppm)	odchylka
F52	C	178.593	0.002
F52	CA	61.396	0.047
F52	CB	38.721	0.059
F52	H	7.783	0.003
F52	N	119.175	0.027
L53	C	178.935	0.004
L53	CA	57.766	0.078
L53	CB	41.385	0.081
L53	H	8.248	0.075
L53	N	121.634	1.517
L54	C	179.875	0.005
L54	CA	57.874	0.047
L54	CB	40.729	0.000
L54	H	8.429	0.003
L54	N	117.908	0.011
D55	C	177.632	0.004
D55	CA	56.260	0.052
D55	CB	40.736	0.058
D55	H	7.717	0.002
D55	N	117.067	0.040
S56	C	174.183	0.001
S56	CA	60.474	0.039
S56	CB	63.612	0.024
S56	H	7.446	0.002
S56	N	114.221	0.029
I57	C	175.673	0.006
I57	CA	61.915	0.044
I57	CB	38.600	0.027
I57	H	7.367	0.002
I57	N	121.257	0.023
K58	C	177.168	0.009
K58	CA	57.145	0.061
K58	CB	31.956	0.061
K58	H	8.149	0.004
K58	N	123.678	0.052
E59	C	175.992	0.003
E59	CA	55.754	0.039
E59	CB	29.095	0.018
E59	H	7.777	0.002
E59	N	120.003	0.037
K60	C	176.227	0.009
K60	CA	57.029	0.046
K60	CB	32.397	0.049
K60	H	8.002	0.003
K60	N	120.543	0.025
Y61	C	175.396	0.006
Y61	CA	57.013	0.110
Y61	CB	37.635	0.039
Y61	H	7.741	0.003
Y61	N	115.636	0.034
N62	C	172.942	0.003
N62	CA	52.521	0.058
N62	CB	41.034	0.039
N62	H	7.464	0.003
N62	N	118.801	0.023
S63	C	173.043	0.016
S63	CA	57.356	0.038
S63	CB	64.052	0.102
S63	H	7.882	0.001
S63	N	114.821	0.024
F64	C	175.677	0.002

skupina	atom	chem. posun (ppm)	odchylka
F64	CA	55.543	0.082
F64	CB	42.748	0.074
F64	H	8.480	0.004
F64	N	119.034	0.037
W65	C	176.076	0.007
W65	CA	58.231	0.046
W65	CB	32.773	0.004
W65	H	9.979	0.002
W65	N	122.801	0.017
I66	C	177.341	0.011
I66	CA	59.415	0.051
I66	CB	41.466	0.079
I66	H	8.397	0.006
I66	N	109.497	0.038
G67	C	172.839	0.003
G67	CA	49.858	0.035
G67	H	10.379	0.002
G67	N	111.900	0.023
L68	C	173.456	0.019
L68	CA	54.653	0.286
L68	CB	46.292	0.014
L68	H	8.509	0.002
L68	N	127.988	0.019
R69	C	173.483	0.000
R69	CA	55.257	0.033
R69	CB	34.023	0.104
R69	H	8.218	0.002
R69	N	122.697	0.024
F70	C	175.263	0.019
F70	CA	58.721	0.034
F70	CB	38.531	0.024
F70	H	7.492	0.002
F70	N	128.427	0.024
T71	C	172.007	0.003
T71	CA	61.421	0.036
T71	CB	71.405	0.023
T71	H	7.778	0.004
T71	N	121.463	0.237
L72	C	175.618	0.000
L72	CA	52.821	0.005
L72	CB	41.908	0.000
L72	H	8.370	0.003
L72	N	125.440	0.030
P73	C	176.353	0.001
P73	CA	63.421	0.000
P73	CB	34.172	0.000
D74	C	175.377	0.007
D74	CA	56.349	0.049
D74	CB	39.275	0.078
D74	H	8.808	0.001
D74	N	122.589	0.020
M75	C	174.263	0.016
M75	CA	55.273	0.027
M75	CB	28.067	0.030
M75	H	8.291	0.005
M75	N	112.071	0.036
N76	C	174.881	0.919
N76	CA	50.788	0.035
N76	CB	41.609	0.027
N76	H	6.673	0.002

skupina	atom	chem. posun (ppm)	odchylka
N76	N	112.771	0.019
W77	C	175.315	0.007
W77	CA	57.441	0.053
W77	CB	29.479	0.023
W77	H	8.815	0.003
W77	N	123.125	0.019
K78	C	177.162	0.004
K78	CA	55.445	0.021
K78	CB	36.739	0.113
K78	H	8.548	0.003
K78	N	121.594	0.013
W79	C	181.039	0.009
W79	CA	56.741	0.068
W79	CB	31.892	0.001
W79	H	8.906	0.002
W79	N	125.458	0.017
I80	C	175.638	0.006
I80	CA	63.488	0.042
I80	CB	38.102	0.381
I80	H	8.449	0.005
I80	N	113.998	0.019
N81	C	176.139	0.001
N81	CA	52.391	0.058
N81	CB	37.558	0.088
N81	H	7.300	0.004
N81	N	116.464	0.028
G82	C	174.448	0.023
G82	CA	45.393	0.054
G82	H	8.521	0.002
G82	N	108.002	0.014
T83	C	174.168	0.005
T83	CA	61.940	0.037
T83	CB	70.629	0.098
T83	H	7.552	0.002
T83	N	113.446	0.037
T84	C	174.316	0.002
T84	CA	63.640	0.050
T84	CB	69.527	0.027
T84	H	8.781	0.002
T84	N	119.514	0.021
F85	C	173.936	0.018
F85	CA	58.550	0.046
F85	CB	40.937	0.060
F85	H	8.419	0.002
F85	N	126.663	0.018
N86	C	174.643	0.009
N86	CA	51.807	0.079
N86	CB	38.840	0.000
N86	H	8.288	0.002
N86	N	127.104	0.056
S87	C	174.493	0.000
S87	CA	58.842	0.140
S87	CB	63.347	0.147
S87	H	8.020	0.006
S87	N	118.752	0.045
D88	C	177.220	0.007
D88	CA	55.715	0.042
D88	CB	40.647	0.095
D88	H	8.320	0.006
D88	N	120.678	0.073
V89	C	174.989	0.002

skupina	atom	chem. posun (ppm)	odchylka
V89	CA	63.740	0.033
V89	CB	33.327	0.074
V89	H	7.569	0.002
V89	N	116.660	0.016
L90	C	173.596	0.000
L90	CA	53.913	0.204
L90	CB	44.600	0.027
L90	H	7.386	0.008
L90	N	118.714	0.040
K91	C	175.449	0.008
K91	CA	54.423	0.079
K91	CB	34.143	0.032
K91	H	7.869	0.003
K91	N	118.820	0.011
I92	C	176.163	0.005
I92	CA	60.460	0.044
I92	CB	39.041	0.067
I92	H	8.250	0.002
I92	N	122.955	0.031
T93	C	173.412	0.018
T93	CA	61.472	0.100
T93	CB	70.536	0.104
T93	H	8.360	0.015
T93	N	122.157	0.060
G94	C	173.951	0.009
G94	CA	44.026	0.051
G94	H	8.322	0.003
G94	N	110.628	0.010
V95	C	176.571	0.004
V95	CA	62.842	0.093
V95	CB	32.599	0.043
V95	H	8.314	0.003
V95	N	119.376	0.016
T96	C	172.976	0.005
T96	CA	61.483	0.040
T96	CB	69.436	0.000
T96	H	8.417	0.004
T96	N	121.116	0.027
E97	C	174.879	0.003
E97	CA	54.385	0.097
E97	CB	31.882	0.080
E97	H	7.314	0.003
E97	N	122.119	0.018
N98	C	175.911	0.005
N98	CA	54.721	0.078
N98	CB	37.969	0.051
N98	H	8.489	0.006
N98	N	118.316	0.075
G99	C	174.660	0.017
G99	CA	45.685	0.043
G99	H	8.399	0.008
G99	N	112.095	0.049
S100	C	173.728	0.010
S100	CA	59.749	0.091
S100	CB	64.202	0.079
S100	H	7.546	0.002
S100	N	116.813	0.027
C101	C	171.688	0.006
C101	CA	59.195	0.211
C101	CB	44.919	0.032
C101	H	9.582	0.005

skupina	chem. posun		
	atom	(ppm)	odchylka
C101	N	123.395	0.030
A102	C	176.264	0.002
A102	CA	51.569	0.050
A102	CB	21.907	0.059
A102	H	8.105	0.002
A102	N	122.884	0.023
T103	C	175.548	0.008
T103	CA	58.393	0.015
T103	CB	72.107	0.072
T103	H	8.894	0.003
T103	N	108.925	0.027
I104	C	175.428	0.027
I104	CA	60.756	0.043
I104	CB	40.642	0.070
I104	H	8.982	0.002
I104	N	116.501	0.031
S105	C	175.380	0.008
S105	CA	56.725	0.080
S105	CB	64.030	0.045
S105	H	8.464	0.002
S105	N	121.408	0.061
G106	C	173.365	0.004
G106	CA	47.798	0.013
G106	H	9.059	0.003
G106	N	117.696	0.010
D107	C	174.893	0.003
D107	CA	53.515	0.065
D107	CB	40.584	0.054
D107	H	8.394	0.002
D107	N	121.876	0.041
K108	C	174.422	0.004
K108	CA	54.887	0.059
K108	CB	35.298	0.028
K108	H	7.684	0.002
K108	N	116.939	0.008
V109	C	176.185	0.005
V109	CA	61.418	0.052
V109	CB	31.264	0.052
V109	H	8.404	0.002
V109	N	122.368	0.016
T110	C	172.702	0.007
T110	CA	59.899	0.056
T110	CB	71.282	0.013
T110	H	9.076	0.002
T110	N	121.302	0.013
S111	C	174.437	0.011
S111	CA	56.615	0.058
S111	CB	64.129	0.119
S111	H	8.108	0.003
S111	N	116.034	0.021
E112	C	175.615	0.009
E112	CA	54.987	0.044
E112	CB	34.480	0.073
E112	H	9.339	0.003
E112	N	126.811	0.015
S113	C	178.141	0.042
S113	CA	58.984	0.084
S113	CB	63.200	0.023
S113	H	8.985	0.002
S113	N	116.481	0.012
C114	C	174.362	0.000

skupina	chem. posun		
	atom	(ppm)	odchylka
C114	CA	58.989	0.177
C114	CB	44.808	0.000
C114	H	9.085	0.002
C114	N	125.176	0.041
S115	C	174.248	0.000
S115	CA	58.561	0.038
S115	CB	63.514	0.016
S115	H	7.877	0.002
S115	N	111.680	0.030
T116	C	170.986	0.004
T116	CA	62.789	0.079
T116	CB	70.296	0.067
T116	H	7.851	0.002
T116	N	118.652	0.006
D117	C	175.054	0.029
D117	CA	53.358	0.249
D117	CB	41.252	0.035
D117	H	7.798	0.003
D117	N	118.778	0.024
N118	C	175.007	0.004
N118	CA	52.790	0.058
N118	CB	42.185	0.061
N118	H	9.051	0.001
N118	N	122.173	0.014
R119	C	175.017	0.002
R119	CA	55.698	0.030
R119	CB	32.205	0.128
R119	H	7.090	0.004
R119	N	117.872	0.020
W120	C	172.475	0.007
W120	CA	57.501	0.076
W120	CB	32.403	0.018
W120	H	8.018	0.003
W120	N	112.159	0.016
I121	C	176.310	0.012
I121	CA	59.518	0.064
I121	CB	41.347	0.114
I121	H	7.005	0.004
I121	N	116.780	0.021
C122	C	174.058	0.005
C122	CA	51.785	0.050
C122	CB	40.593	0.042
C122	H	8.695	0.004
C122	N	120.889	0.017
Q123	C	173.773	0.007
Q123	CA	53.870	0.029
Q123	CB	34.799	0.014
Q123	H	10.038	0.004
Q123	N	117.054	0.029
K124	C	175.076	0.003
K124	CA	55.238	0.066
K124	CB	37.021	0.038
K124	H	9.143	0.004
K124	N	120.782	0.043
E125	C	176.150	0.003
E125	CA	56.162	0.103
E125	CB	31.087	0.045
E125	H	8.617	0.002
E125	N	121.997	0.020
L126	C	176.608	0.009
L126	CA	55.112	0.118

skupina	atom	chem. posun (ppm)	odchylka
L126	CB	42.230	0.027
L126	H	8.320	0.004
L126	N	123.249	1.427
N127	C	174.558	0.000
N127	CA	53.026	0.075
N127	CB	38.934	0.000
N127	H	8.324	0.003
N127	N	118.112	0.010
K129	C	176.250	0.001
K129	CA	55.981	0.044
K129	CB	33.099	0.000
T130	C	172.880	0.000
T130	CA	59.984	0.051
T130	CB	69.660	0.000
T130	H	8.211	0.001
T130	N	118.526	0.069
D134	C	175.277	0.006
D134	CA	54.418	0.037
D134	CB	41.224	0.020
S135	C	178.625	0.000
S135	CA	60.082	0.014
S135	CB	64.938	0.000
S135	H	7.785	0.002
S135	N	120.944	0.010

