

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie



**Optimalizace protokolů pro poskládání a purifikaci
rekombinantních forem membránových receptorů
zabiječských buněk**

Bakalářská práce
studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Vedoucí bakalářské práce: Prof. Dr. Karel Bezouška, CSc.

Praha 2007

Alžběta Davidová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. Dr. Karla Bezoušky, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a MBÚ AV ČR.

V Praze dne 4.6.2007.....

..... Davidová

Podpis

Děkuji svému školiteli Prof. Dr. Karlu Bezouškovi, CSc. za vedení bakalářské práce, za jeho rady, ochotu a pomoc při jejím vypracovávání.

Děkuji celému kolektivu Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR za jejich pomoc a ochotu při přípravě experimentů.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	5
1 Teoretický úvod	6
1.1 Imunitní systém, jeho složky a funkce	6
1.1.1 Imunitní systém	6
1.1.2 Složky imunitního systému	6
1.1.3 NK buňky	7
1.1.4 Receptory NK buněk	8
1.1.5 NKR-P1 receptor	8
2 Cíle práce	10
3 Materiály a metody	11
3.1 Materiál	11
3.1.1 Chemikálie	11
3.1.2 Pufry	12
3.1.3 Přístroje a pomůcky	12
3.2 Metody	13
3.2.1 Produkce a příprava inkluzních tělísek	13
3.2.2 Poskládání proteinů – refolding I. (2 varianty, pro NKR-P1A)	13
3.2.3 Poskládání proteinů – refolding II.	14
3.2.4 Poskládání proteinů – refolding III.	15
3.2.5 Poskládání proteinů – refolding IV.	15
4 Výsledky	18
4.1 Refolding I.	18
4.2 Refolding II.	19
4.3 Refolding III.	20
4.4 Refolding IV.	21
5 Diskuse	25
6 Výsledky	28
7 Použitá literatura	29

Seznam použitých zkratk

A ₂₈₀	absorbance látky při vlnové délce 280 nm
AUFS	„absorbance units full scale“, počet absorbačních jednotek v rozsahu zápisu
CD	„cluster of differentiation“, diferenciační skupina, označení povrchových molekul
CDR	„carbohydrate recognition domain“, sacharid rozpoznávající doména
Da	jednotka molekulové hmotnosti
DNA	deoxyribonukleová kyselina
IPTG	isopropyl-thio- β -D-galaktosid
KIR	„killer inhibitor receptors“, imunoglobulinové inhibiční receptory
LGL	„large granular lymphocyte“, velké granulární lymfocyty
MHC	„major histocompatibility complex“, hlavní histokompatibilní komplex
NCAM-1	„neural cellular adhesion molecule-1“, označení adhezní molekuly CD56 v nervové tkáni
NK buňky	„natural killer“, přirozeně zabíjející buňky
NMR	nukleární magnetická rezonance, spektroskopie využívající interakce atomových jader s magnetickým polem

1 Teoretický úvod

1.1 Imunitní systém, jeho složky a funkce

1.1.1 Imunitní systém

Jednou z nejdůležitějších funkcí imunitního systému je obrana proti infekčním nemocem. Organismus je neustále vystavován obrovskému množství infekčních mikroorganismů, jako jsou bakterie, viry a plísňe. Tyto mikroorganismy způsobují celou řadu nemocí – některé z nich jsou poměrně časté a nepříliš závažné, jiné naopak vzácnější, zato daleko nebezpečnější.

Nezáleží na tom, zda je infekce způsobena virem, bakterií nebo plísní, zda je relativně neškodná, či naopak závažná a kde přesně se v těle nachází. Správně fungující imunitní systém musí být schopen rozpoznat, co je pro organismus bezpečné a co nebezpečné. (Již je překonán názor, že rozpoznává vlastní od cizího. I vlastní buňky mohou být v některých případech pro organismus nebezpečné.) Následně se podílí na zajištění tří základních procesů v organismu - obranyschopnosti, homeostázy a imunitního dohledu. Účastní se i obnovy a regenerace poškozené tkáně.¹

1.1.2 Složky imunitního systému

Buňky imunitního systému jsou přítomny v celém organismu, vznikají a dozrávají však v centrálních lymfatických orgánech, např. v kostní dřeni. Imunitní reakce potom probíhá v periferních lymfatických orgánech, zejména ve slezině, mízních uzlinách, slizniční lymfatické tkáni. Buňkami přímo se účastnícími imunitní reakce jsou lymfocyty, leukocyty, monocyty a tkáňové makrofágy, buňky mízních uzlin a další pomocné buňky – trombocyty, endotelie, žírné buňky a fibroblasty.

Složky imunity se podle způsobu rozpoznávání antigenu dělí na nespecifické a specifické. Specifické rozpoznávají antigeny přímo prostřednictvím receptorů citlivých na jednotlivé antigeny, nespecifické složky tyto schopnosti nemají.

Dále můžeme složky imunity dělit na humorální a buněčné podle toho, zda se v efektorové části imunitní reakce uplatňují více buňky nebo humorální faktory. Humorální imunita je zajišťována součástmi séra, tedy protilátkami a systémem

bílkovin nazývaným komplement. V případě buněčné imunity hrají významnou roli makrofágy, T lymfocyty, NK buňky („natural killer“ – „přirozeně zabíjející“) a cytokiny - informační a regulační molekuly, které jsou NK buňkami produkovány. Obranná schopnost je v případě buněčné imunity nazývána cytotoxicitou.

1.1.3 NK buňky

NK buňky byly objeveny v roce 1975. Byly jako neadherentní, nefagocytující buňky zařazeny do skupiny lymfocytů (nositelé specifické imunity). Lymfocyty po prvním střetnutí s cizorodou látkou zachovávají dlouhodobé informace. Tyto informace jsou uloženy ve formě lymfocytárních klonů tzv. paměťových buněk s dlouhou dobou života. Proto jsou lymfocyty schopné při opakovaném střetnutí s tím samým antigenem reagovat rychleji a intenzivněji. NK buňky ale nemají antigenně specifické receptory, jsou tak důležitou součástí nespecifické imunity.

Dělením na sedimentačním gradientu se ukázalo, že se morfologicky jeví jako velké granulární lymfocyty (LGL), tj. lymfoidní buňky s bohatší cytoplazmou, ve které se nacházejí drobná červená granula s azurofilními zrny (granula obsahují perforin a granzymy), kompaktní jádro bývá z jedné strany vchlípené.^{2, 3} O vývojové blízkosti T lymfocytů a NK buněk svědčí exprese společných membránových antigenů (CD34, CD16) zejména v časných vývojových stádiích. NK buňky se oddělují od T lymfocytární linie.^{4,3}

Liší se membránovými antigeny, přepisem některých genů, působí absolutně samostatně a na svoji činnost nepotřebují dostávat signály od jiných imunitních buněk. Vznikají v kostní dřeni a vykazují charakteristickou orgánovou distribuci, jejich aktivita je nejvyšší v periferní krvi a pak postupně klesá v pořadí slezina, lymfatické uzliny, játra a kostní dřeň. Nejsou obsaženy v thymu. NK buňky jsou klíčové při ochraně před cizorodými prvky. Zabíjejí buňky, které se snaží uniknout cytotoxickým T buňkám tím, že potlačují expresi MHC glykoproteinů I. třídy na svém povrchu.⁵ NK buňky se spolu s interferonovým systémem účastní obrany organismu proti virům (rozpoznávají a zabíjejí buňky nakažené virem) i dalším mikrobiálním škůdcům. Významně se uplatňují v protinádorovém dozoru a kontrole rozvoje metastáz. Na zásah NK buněk se ukázaly citlivé leukemické buňky, buňky lymfoblastových linií a také určité typy normálních

buněk, například embryonální buňky a kmenové buňky. NK buňky se účastní také reakce odmítnutí štěpu při transplantaci kostní dřeně.

Pokud NK buňka narazí na normální buňku, přechodně se na ni adhezuje pomocí řady nespecifických adhezivních molekul. Když po chvíli NK receptory najdou MHC molekuly, dá to NK buňce signál k odpoutání. Pokud však MHC molekuly nalezeny nejsou, aktivují se cytotoxické mechanismy a podezřelá buňka je zabita.²⁰ Výjimečnými buňkami, které na povrchu nemají téměř žádné MHC glykoproteiny, jsou červené krvinky. Ty nejsou NK buňkami napadány zřejmě proto, že jim chybí některé důležité adhezivní molekuly.

Nejpřesnější identifikaci NK buněk umožňuje průkaz jejich specifických membránových molekul. Z nich zřejmě nejdůležitější je molekula CD56, která je exprimována na NK buňkách a částečně také na T lymfocytech. Molekula CD56 slouží jako adhezní molekula v homotypických adhezních interakcích. Mimo hematopoetickou tkáň je bohatě obsažena v nervové tkáni a je označována jako NCAM-1 (neural cellular adhesion molecule-1). Pro praktický průkaz je používána kombinace 3 znaků a to CD3, CD56 a CD16, který představuje nízkoafinní receptor pro Fc fragment IgG. Buňky, které jsou CD56+/CD16+/CD3-, jsou považovány za NK buňky.⁶

1.1.4 Receptory NK buněk

Základní rozdělení receptorů NK buněk je na aktivační a inhibiční. Inhibiční se dále dělí podle strukturních skupin na imunoglobulinové (KIR – „Killer inhibitor receptors“) a C-lektinové. Aktivační receptory jsou povrchové lektiny rozeznávající některé z obecně přítomných struktur na povrchu buněk. Aktivují NK buňku k zákroku.

1.1.5 NKR-P1 receptor

NKR-P1 je receptor objevený u potkanů pomocí protilátky rozpoznávající sacharidovou strukturu na povrchu NK buněk.⁷ Precipitace protilátkou ukázala, že jde o disulfidicky spojený homodimer.^{8, 9} Na základě experimentů bylo zjištěno, že je NKR-P1 transmembránový protein II. typu a že jeho doména odpovídá lektinovým doménám C-typu.¹⁰ Při dalším studiu prováděném u potkanů byly postupně objeveny a pojmenovány čtyři homologní geny kódující izoformy NKR-P1A, B, C a D.^{2, 11, 12}

I v mikrodoménách lidských zabiječských buněk byl nalezen aktivační receptor NKR-P1A (CD161).

Studie ukázaly, že receptor NKR-P1A je jedním z nejdůležitějších receptorů. hrajících roli v aktivaci NK buněk. Tento receptor je složen z N-konce signální sekvence, transmembránové domény, extracelulární ligand-vazebné domény (fragment DNA kódující 101 aminokyselin, W₁₁₅–K₂₁₅) a krátkého C-konce.¹¹

V počátečních experimentech byl rozpustný NKR-P1A produkován ve dvou formách, jako extracelulární části receptoru a sacharid rozpoznávající domény.¹³ Tyto proteiny ale vykazovaly nízkou stabilitu. Na základě dalších studií a experimentů byly za použití bakteriálních expresních vektorů připraveny rekombinantní proteiny NKR-P1A a NKR-P1B, izolována inkluzní tělíska a v roztoku renaturačního pufru podrobena dialýze. Následné ověření úspěšnosti metody - stanovení čistoty a identifikace proteinů – bylo provedeno několika metodami. Ukázalo se, že tyto dva proteiny, lišící se ve své stavbě pouze v 5 aminokyselinách, vydávají rozdílné, protichůdné signály - aktivační (NKR-P1A) a inhibiční (NKR-P1B).

Byly popsány vazebné experimenty s jejich rekombinantními ligand-vazebnými doménami. Byla potvrzena reaktivita NKR-P1A se sulfatovanými disacharidy a kyselými sacharidy se zbytky sulfátů či fosfátů.¹⁴ Kromě sacharidových a hůře finančně dostupných ligandů mají stabilizující účinek i ligandy GlcNAc (N-acetylglukosamin) nebo vápník. Při vazbách s monosacharidovými ligandy nebyly u izoform A a B nalezeny rozdíly, velké odlišnosti se však potvrdily ve vazbách s oligosacharidy a glykodendrimery. Přítomnost glykodendrimerů má stimulační účinek na aktivaci NKR-P1A.^{15, 11}

2 Cíle práce

- Experimentální nalezení optimálního protokolu pro poskládání a purifikaci membránových receptorů NKR-P1A a NKR-P1B.
- Ověření homogenity proteinových preparátů, připravených podle optimalizovaného protokolu.

3 Materiály a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Akrylamid	Sigma, USA
L-arginin hydrochlorid (L-arginin-HCl)	Sigma, USA
Azid sodný (NaN_3)	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, USA
Cystamin	Sigma, USA
Cysteamin	Sigma, USA
Deoxyribonukleasa (DNAsa)	Sigma, USA
Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Švýcarsko
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Jersey Lab Supply, USA
Ethanol	Lachema, ČR
fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma, USA
Glutathion oxidovaný (GSSG)	Lach-ner, s.r.o., ČR
Glutathion redukovaný (GSH)	Lach-ner, s.r.o., ČR
Guanidin hydrochlorid (Guanidin-HCl)	Jersey Lab Supply, USA
Hydroxid sodný (NaOH)	Lachema, ČR
Chlorid sodný (NaCl)	Lachema, ČR
Chlorid hořečnatý (MgCl_2)	Lachema, ČR
Chlorid vápenatý (CaCl_2)	Lachema, ČR
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Fluka, Švýcarsko
Kyselina chlorovodíková (HCl)	Lachema, ČR
Kyselina trifluoroctová (TFA)	Lachema, ČR
Leupeptin	Sigma, USA
Oktylglukosid	Serva, USA
Pepstatin	Sigma, USA
PIPES	Sigma, USA
Q-Sepharosa	Pharmacia, Švédsko

Ribonukleasa A (RNAsa A)	Sigma, USA
Sacharosa	Lach-ner, s.r.o., ČR
Superdex 200HR	Pharmacia, Švédsko
TES	Sigma, USA
Tris-HCl	Jersey Lab Supply, USA

Všechny použité chemikálie byly nejvyšší komerčně dostupné čistoty, nejméně však čistoty p.a.

3.1.2 Pufry

PIPES	10 mM PIPES, 50 mM NaCl, 1 mM NaN ₃ , pH 6,8
TES	10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0

3.1.3 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety	Gilson, USA
Centrifuga J2-21	Beckman, USA
Centrifuga Z 233 MK-2	Hermle, Německo
Centrifuga Spectrofuge 16M	Edison, USA
Centricon 10	Millipore, USA
Centriprep 10	Millipore, USA
Dialyzační střeva	Spectrum Laboratories, USA
Chladnička	Whirpool, USA
Kolona pro chromatografii na obrácené fázi C-4	Vydac, USA
Kyveta do UV/VIS oblasti	Beckman, Německo
Ledovač UBE 50-35	Ziegra, Německo
Magnetická míchačka MM 2A	Lab. Přístroje Praha, ČR
Mrazicí box MDF-1155ATN	Sanyo, Japonsko
pH metr	Beckman, Německo
Předvážky HF-1200G	AND, USA
Souprava pro elektroforézu	Sigma, USA
Spektrofotometr DU-70	Beckman, Německo
Ultracentrifuga Optima LE-80K	Beckman, Německo

Ultrazvuková sonda Ultrasonic
Vysokotlaká skleněná kolona
Zdroj deionizované vody Milli Q

Cole-Parmer Instrument Co., USA
Merck, Německo
Millipore, USA

3.2 Metody

3.2.1 Produkce a příprava inkluzních tělísek

Produkční klony bakterie *Escherichia coli* kmen BL-21Gold (Stratagene) transformované expresními plasmidy pETNKR-P1A a pETNKR-P1B byly zaočkovány do baněk obsahujících 500 ml čerstvého média a třepány přes noc při 37°C. Ráno byly kultury indukovány 1 mM IPTG a kultivace pokračovala. Celkem kultivace trvala 24 hodin.

Média se vzrostlými kulturami byla centrifugována v centrifugačních lahvích o objemu 1l, usazené bakterie promyty pufrům TES a umístěny do 30 ml centrifugačních kyvet.

Bakterie byly resuspendovány sonikací ve 20 ml sacharosového pufru (25 % sacharosa v TES pufru). Po přidání inhibitorů proteas 1 μ M leupeptinu a 1 μ M pepstatinu byla suspenze celkem čtyřikrát zmrazena, rozmrazena v horké vodě a deset minut sonikována. Byl přidán 10 mM MgCl₂, 10 U / ml DNAsy I a 10 U / ml RNAsy A. Kultura byla sonikována a centrifugována.

Sedimentovaný protein byl resuspendován v 20 ml TES pufru s 0,1 % oktylglukosidem. Suspenze byla sonikována a centrifugována. Precipitovaný protein byl promyt TES pufrům a suspenze byla opět sonikována a centrifugována.

3.2.2 Poskládání proteinů – refolding I. (2 varianty, pro NKR-P1A)

Inkluzní tělíska byla rozpuštěna v 5 ml roztoku obsahujícího 6 M Guanidin-HCl pH 8.0 a 100 mM DTT. Vzniklý roztok byl sonikovány na ledu, 1 hodinu inkubován při 37°C a 30 minut centrifugován v ultracentrifuze Beckman Optima LE-80K při 45 tis.ot./min v rotoru 70.1 Ti (Beckman).

Renaturační pufr byl připraven v objemu 2 x 500 ml a měl složení pro variantu:

A: 50 mM Tris-HCl pH 8.5 + 1 M L-arginin + 5 mM EDTA + 5 mM GSH + 1 mM GSSG + 0.5 mM PMSF + 1 μ M leupeptin + 1 mM NaN₃

B: 50 mM Tris-HCl pH 8.5 + 1 M L-arginin + 5 mM CaCl₂ + 5 mM GSH + 1 mM GSSG + 0.5 mM PMSF + 1 μ M leupeptin + 1 mM NaN₃

Pufry byly zchlazeny v chladicí místnosti na 4°C a za stálého míchání do nich byl cca po 5 minutách přikapáván po 0,5 ml roztok denaturovaného proteinu, do každého z obou pufřů tedy 2,5 ml. Vzniklé roztoky byly míchány v chladu ještě cca 2 hodiny. Poté byl do obou přidán PMSF do 1 mM koncentrace. Následně byly roztoky přeneseny do dialyzačních trubic a byla zahájena dialýza proti 8 l následujících pufřů:

varianta A: 20 mM Tris-HCl pH 8.5 + 30 mM NaCl + 1 mM EDTA + 1 mM NaN₃

varianta B: 20 mM Tris-HCl pH 8.5 + 30 mM NaCl + 1 mM NaN₃

Pufry byly během dialýzy 2 x vyměněny. Pufr obsahující vysrážený protein byl centrifugován, přefiltrován přes celulóзовou membránu a filtrát byl nanesen na kolonu Q-Sepharosy ekvilibrovanou dialyzačním pufřem ve složení: 20 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM NaN₃. Navázané proteiny byly eluovány gradientem NaCl od 19 mM do 1 M.

Frakce NKR-P1A z Q-Sepharosy FF obsahující požadované proteiny byly spojeny a zkoncentrovány pomocí Centriprepu 10 a Centriconu 10 do celkového objemu 100 μ l.

3.2.3 Poskládání proteinů – refolding II.

Izolovaná inkluzní tělíska byla rozpuštěna v 2 x 5 ml roztoku obsahujícího 6 M Guanidin-HCl pH 8.0 a 100 mM DTT. Roztoky byly za stálého chlazení sonikovány a poté inkubovány při 37°C 1 hodinu. Po dobu 30 minut byly centrifugovány v ultracentrifuze Beckman Optima LE-80K při 45 tis.ot./min v rotoru 70.1 Ti (Beckman).

Byl připraven renaturační pufr o objemu 2 x 500 ml o složení: 50 mM Tris-HCl pH 8.5 + 1 M L-arginin + 100 mM CaCl₂ + 9 mM GSH + 2 mM GSSG + 1mM NaN₃ + 1 mM PMSF + 1 μ M leupeptin. Pufr byl zchlazen na 4°C.

Do připraveného pufřu byly postupně po kapkách a za stálého míchání přidávány roztoky proteinů. Po přidání veškerého množství roztoků proteinů byly pufry ještě asi 1

hodinu mícháány v chladu a poté přeneseny do dialyzačních střev. Proběhla dialýza proti 8 L 15 mM Tris-HCl pH 8.5 + 24 mM NaCl + 1 mM NaN₃. Dialýza byla jednou vyměněna.

Vzorek byl centrifugován, filtrován a protein se vychytával na Q-Sepharose ekvilibrované Tris-HCl pH 8.5 pufrém, vše probíhalo shodným postupem jako v předcházející kapitole.

Frakce monomerního NKR-P1A z Q-Sepharosy FF obsahující požadované proteiny byly spojeny a zkoncentrovány pomocí Centriprepu 10 a Centriconu 10 do celkového objemu 100 μ l. Připravený vzorek proteinu byl nanesen na gelově filtrační kolonu Superdex 200 10 x 280 mm. ekvilibrovanou 10 mM Herpes pufrém pH 7.5, 0.1 M NaCl a 1 mM NaN₃. Eluce proteinu byla sledována spektrofotometricky při 280 nm, frakce byly sbírány manuálně.

3.2.4 Poskládání proteinů – refolding III.

Izolovaná inkluzní tělíska byla rozpuštěna v 6 M Guanidin-HCl a 100mM DTT pH 8.0, roztoky byly sonikovány, inkubovány a centrifugovány jako v předcházejícím protokolu. Složení renaturačního pufru bylo následující: 50 mM Tris-HCl pH 8.5 + 0,5 M L-arginin + 50 mM CaCl₂ + 9 mM GSH + 2 mM GSSG + 1 mM NaN₃ + 1 mM PMSF + 1 μ M leupeptin. Další postup byl shodný s protokolem II. Proteinové frakce z Q-Sepharosy byly spojeny, zkoncentrovány a poté naneseny na gelově filtrační kolonu Superdex 200. Eluce proteinu byla sledována spektrofotometricky při 280 nm.

3.2.5 Poskládání proteinů – refolding IV.

Izolovaná inkluzní tělíska byla rozpuštěna v 2 x 5 ml roztoku obsahujícího 6 M Guanidin-HCl a 100 mM DTT pH 8.0. Do vzniklých roztoků byly do koncentrací 1 μ M přidány leupeptin a pepstatin. Roztoky byly sonikovány na ledu a poté inkubovány při 37°C 1 hodinu. Poté byly zakalené roztoky centrifugovány v ultracentrifuze Beckman Optima LE-80K při 45 tis. ot./min v rotoru 70.1 Ti (Beckman) po dobu 30 minut.

Byl připraven renaturační pufr o objemu 2 x 500 ml a následujícím složení: 50 mM Tris-HCl pH 8.5 + 1 M L-arginin + 100 mM CaCl₂ + 3 mM cystamin + 9 mM cysteamin + 1 mM NaN₃. Připravený pufr byl zchlazen v chladové místnosti při 4°C.

Do pufru o teplotě 4°C byly přidány inhibitory proteas 1 mM PMSF, 1 μ M leupeptin a 1 μ M pepstatin. Za stálého míchání byly do pufrů postupně po kapkách přidávány

roztoky denaturovaných proteinů. Po přidání veškerého množství roztoků proteinů byly pufrы ještě asi 1 hodinu míchány v chladu a poté přeneseny do dialyzačních střeV. Pufr byl dialyzován proti 8 L 15 mM Tris-HCl pH 8.5 + 20 mM NaCl + 1 mM NaN₃. Dialýza byla jednou vyměněna.

Po dialýzách byl roztok proteinu nanesen rychlostí 8 ml / min na kolonu Q-Sepharosy FF o rozměrech 1.6 x 14 cm ekvilibrovanou dialyzačním pufrem. Po nanesení vzorku byla kolona promyta dialyzačním pufrem, a navázané proteiny eluovány gradientem NaCl od 9 mM do 1 M, který trval 120 min. Proteinové frakce sledované při A₂₈₀ byly manuálně jímány a dále analyzovány SDS elektroforesou.

Další purifikace NKR-P1A a NKR-P1B proteinů chromatografií na obrácené fázi a gelovou chromatografií

Frakce z Q-Sepharosy FF obsahující požadované proteiny byly spojeny a okyseleny koncentrovanou kyselinou trifluoroctovou (TFA) na pH 2.0. Tyto frakce byly nanášeny na preparativní kolonu pro chromatografii na obrácené fázi Vydac C-4 o rozměrech 10 x 250 mm, ekvilibrovanou 0,1 % roztokem TFA ve vodě. Po aplikaci vzorku byly proteiny 60 min eluovány gradientem acetonitrilu od 30% do 50 %, eluce proteinů byla sledována spektrofotometricky při 280 nm.

Z proteinů přečištěných na obrácené fázi byl odpařen acetonitril na rotační vakuové odparce, kyselý roztok proteinu byl poté neutralizován 1 M Tris-HCl pufrem pH 8.0 na pH 6.8. Protein byl koncentrován pomocí centrifugačních koncentrátorů Millipore na výsledný objem 200 μl.

Připravený roztok proteinu byl nastříknut na gelové filtrační kolonu obsahující Superdex 200HR o rozměrech 10 x 280 mm ekvilibrovanou 10 mM PIPES pufrem pH 6.8 s 50 mM NaCl a 1 mM NaN₃. Eluce proteinu byla sledována spektrofotometricky při 280 nm. Pík odpovídající monodisperznímu proteinu eluovanému ve formě nekovalentního dimeru byl zakoncentrován na 20 mg/ml, a uchováván v elučním pufru v lednici.

Ověření homogenity proteinových preparátů SDS elektroforesou za redukujících a neredukujících podmínek

Byly připraveny 15 % SDS polyakrylamidové gely. Vzorky byly 5 min vařeny ve vzorkovém pufru: 1. v přítomnosti DTT (redukující podmínky), 2. bez přítomnosti DTT (neredukující podmínky). Gely byly obarveny barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250 a vizuálně hodnoceny.

V případě neredukujících podmínek je vidět zřetelný posun v elektroforetické mobilitě, který je způsoben větší kompaktností molekuly zesíťované disulfidovými můstky.

Ověření homogenity proteinových preparátů hmotnostní spektrometrií s iontově cyklotronovou resonancí

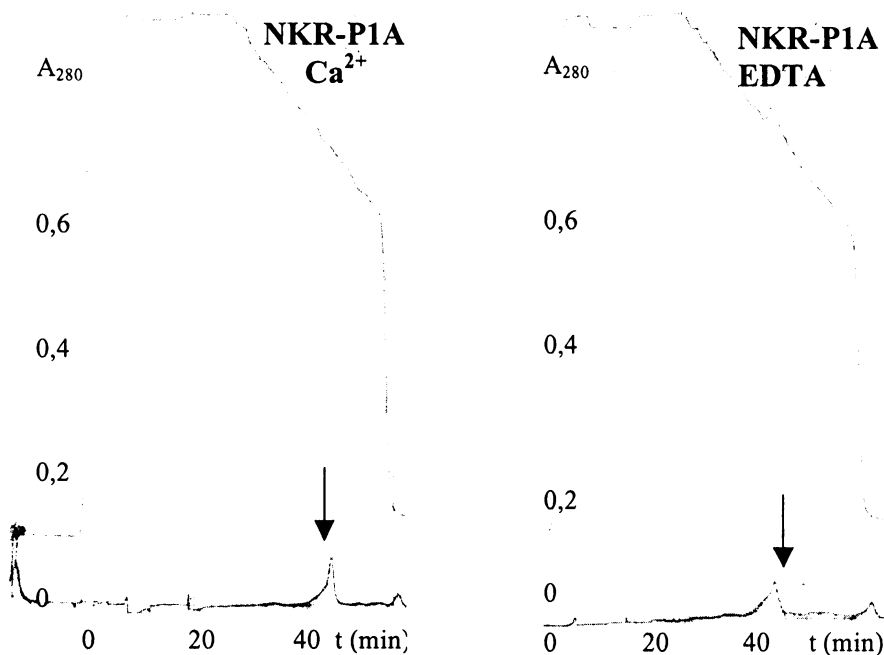
Vzorky proteinů byly odsoleny na koloně s obrácenou fází. Byly ionizovány technikou elektrospreje a hmotnost vzniklých iontů analyzována na FT-MS analyzátoru s iontově cyklotronovou resonancí. Tento experiment prováděl zkušený operátor hmotnostního spektrometru Mgr. Petr Pompach PhD.

4 Výsledky

4.1 Refolding I.

Byla provedena chromatografie na Q-Sepharose pro porovnání úspěšnosti protokolu s obsahem CaCl_2 a EDTA v renaturačních pufrch. Obě probíhaly za shodných podmínek.

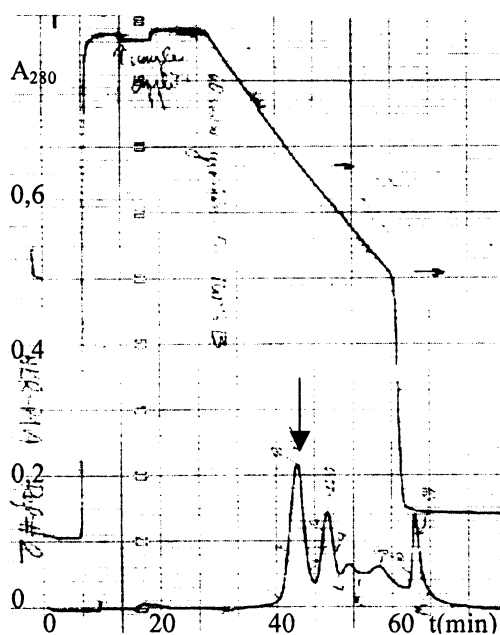
Pufry obsahující denaturované proteiny byly po centrifugaci a filtraci naneseny na kolonu Q-Sepharosy. NKR-P1A byl eluován ze sloupce Q-Sepharosy za vzrůstající koncentrace NaCl (od 19 mM do 1 M). Správně poskládanému proteinu odpovídá 1. monodisperzní pík. Ten je v případě použití CaCl_2 viditelně vyšší než za použití EDTA, prostředí vápníku je tedy pro poskládání proteinu vhodnější.



Obr. 1.: Eluce NKR-P1A na koloně Q-Sepharosy, protein byl eluován gradientem NaCl . (sledováno konduktometricky - horní křivka). Spodní křivka znázorňuje koncentraci proteinu. Vlevo protein připravený podle protokolu B za přítomnosti Ca^{2+} , vpravo podle protokolu A v prostředí EDTA. Eluce proteinů byla sledována průtokovým spektrofotometrickým detektorem při 280 nm s citlivostí 1 AUFS. Šipkou jsou označeny frakce odpovídající poskládanému NKR-P1A proteinu.

4.2 Refolding II.

NKR-P1A byl eluován ze sloupce Q-Sepharosy za vzrůstající koncentrace NaCl (od 19 mM do 1 M koncentrace), 1. monodisperzní pík odpovídá správně poskládanému proteinu. K eluci agregovaného proteinu dochází při vyšší koncentraci soli ke konci chromatogramu. Eluce byla sledována při 280 nm. Frakce byly sbírány manuálně.

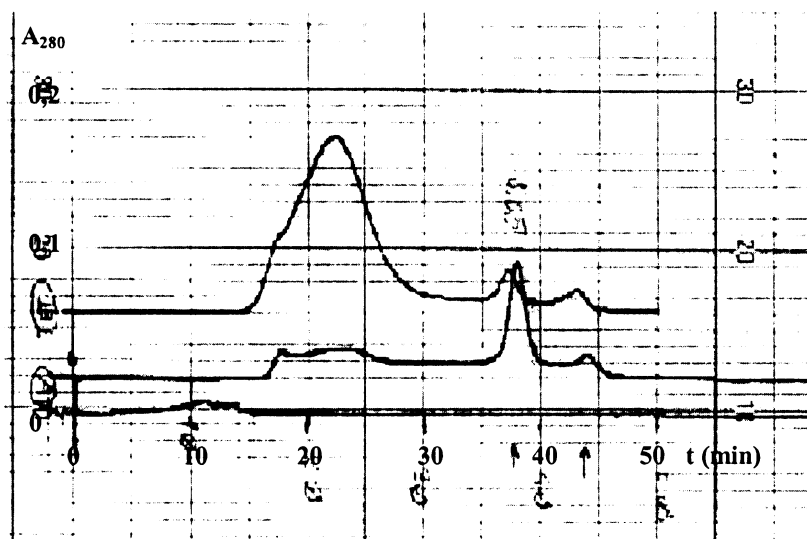


Obr. 2.: Eluce NKR-P1A na koloně Q-Sepharosy za vzrůstající koncentrace NaCl. Spodní křivka znázorňuje koncentraci proteinu, horní křivka je konduktometrický záznam kvality použitého gradientu. Eluce proteinů byla sledována průtokovým spektrofotometrickým detektorem při 280 nm (citlivost 1 AUFS). Šipkou je označena frakce odpovídající poskládanému NKR-P1A proteinu.

4.3 Refolding III.

Spojené a zakoncentrované proteinové frakce z Q-Sepharosy byly nanášeny na gelově filtrační kolonu Superdex 200. Eluce proteinu byla sledována spektrofotometricky při 280 nm. Proteinové frakce z Q-Sepharosy byly spojeny, zakoncentrovány a poté nanášeny na gelově filtrační kolonu Superdex 200. Eluce proteinu byla sledována spektrofotometricky při 280 nm. Výtěžek obou proteinů byl malý, dimery se eluovaly mezi 35. a 40. minutou, monomery potom mezi 40. a 45. minutou. Mezi 18. a 25. minutou se v tzv. „mrtvém objemu“ eluovaly agregované, tedy nesprávně poskládané proteiny.

Refolding III. byl neúspěšný, po porovnání protokolů číslo II. a III. lze jako důvod uvést nižší koncentraci argininu (použit 0,5 M L-arginin oproti 1 M L-argininu v protokolu II.) a CaCl_2 (použit 50 mM oproti 100 mM v protokolu II.).

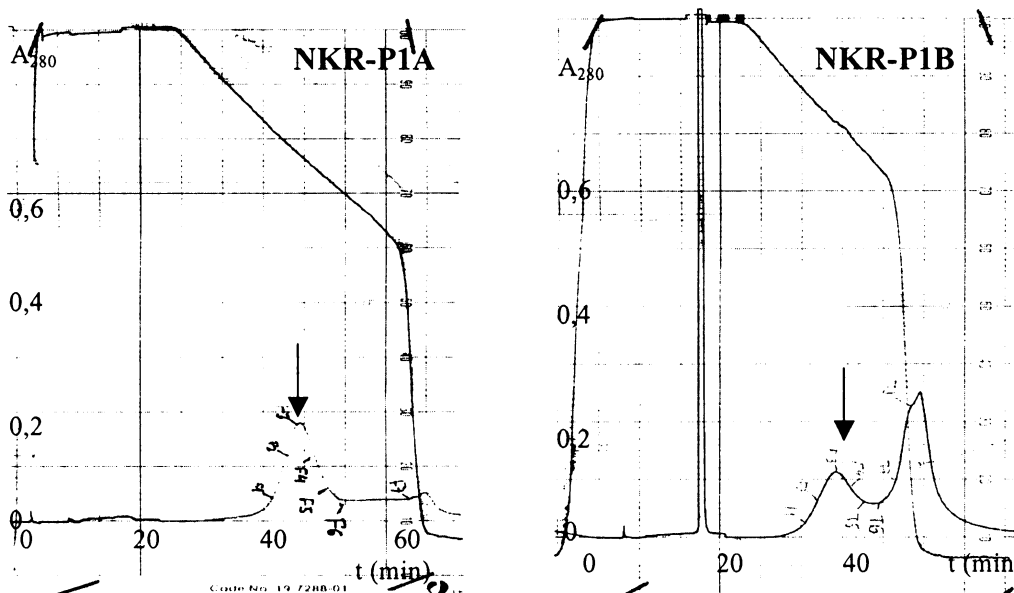


Obr. 4.: Gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200. Analýza proteinu poskládaného za různých experimentálních podmínek. Horní dráha: 0,5 M L-arginin a 50 mM CaCl_2 . Spodní dráha: 1 M L-arginin a 100 mM CaCl_2 . Dráha pod oběma chromatogramy pochází z kontrolního experimentu, při kterém byl na kolonu nastříknut pouze eluční pufr. Eluce proteinů byla sledována spektrofotometricky při 280 nm s citlivostí 1 AUFS. Frakce byly jímány po 1 min. Jako první se eluovaly agregované proteiny (18.-25. min), následovaly dimery (35.-40. min) a monomery (40.-45. min).

4.4 Refolding IV.

NKR-P1A byl eluován ze sloupce Q-Sepharosy za vzrůstající koncentrace NaCl (od 19 mM do 1 M koncentrace, délka trvání 120 min). Správně poskládanému proteinu odpovídá 1. monodisperzní pík. K eluci agregovaného proteinu dochází při vyšší koncentraci soli na konci chromatogramu. Tam je pík velice slabý, nesprávně se poskládalo jen malé množství proteinu.

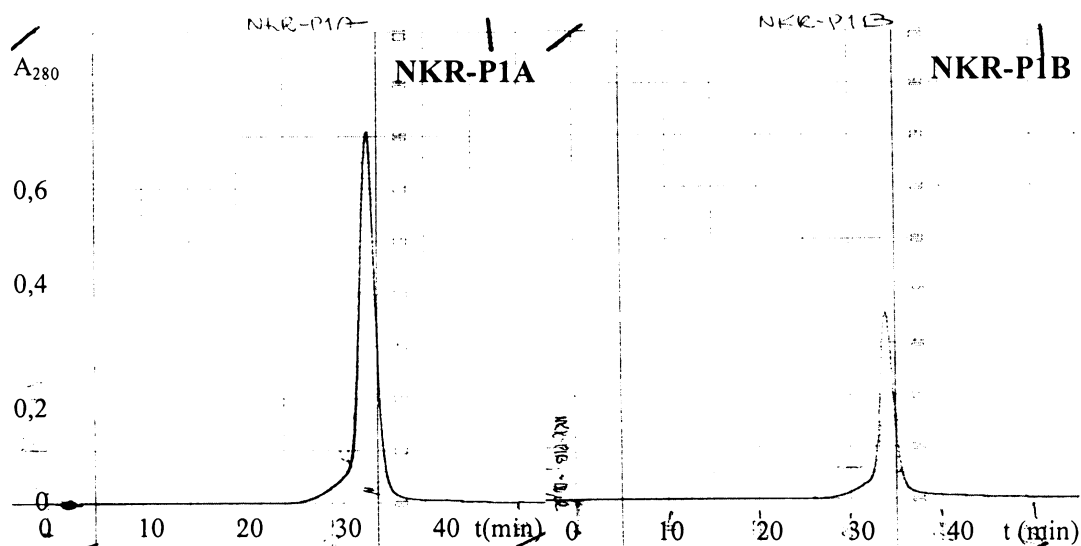
NKR-P1B byl eluován za shodných podmínek, obsahoval větší objem nesprávně poskládaných agregátů než správně poskládaného proteinu. Výtěžek NKR-P1B byl proto nižší než NKR-P1A.



Obr. 5.: Přečištění proteinů - eluce NKR-P1A (vlevo) a NKR-P1B (vpravo) na koloně Q-Sepharosy FF. Proteiny byly eluovány gradientem NaCl (sledováno konduktometricky - horní křivka). Eluce proteinů byla sledována průtokovým spektrofotometrickým detektorem při 280 nm (citlivost 1 AUFS). Správně poskládanému preparátu odpovídá pík na počátku gradientu (označeno šipkou), pík na konci chromatogramu odpovídá agregovanému proteinu. Frakce byly sbírány manuálně dle značení.

Ověření monodisperzity poskládaných preparátů gelovou chromatografií

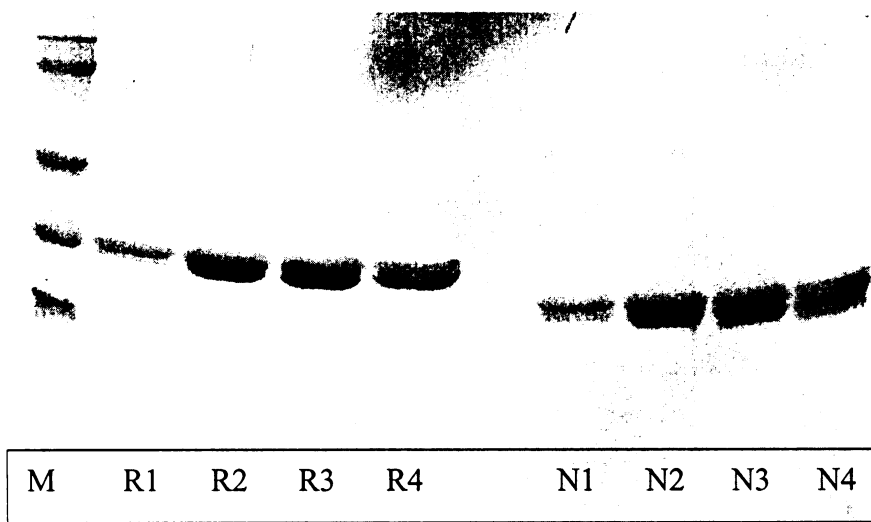
Na eluci proteinů sledované při 280 nm se potvrdila monodisperzita obou preparátů. Proteiny se eluovaly při elučním objemu odpovídajícím velikosti asi 30 kDa. Teoretická hmotnost těchto proteinů, vypočítaná z jejich aminokyselinových sekvencí, je asi 15 kDa. Oba proteiny se tedy v roztocích vyskytovaly pouze ve formě nekovalentních dimerů. Výtěžek NKR-P1B byl nižší než NKR-P1A, jak ukázala již předchozí analýza.



Obr. 6.: Ověření monodisperzity poskládaných proteinů NKR-P1A (vlevo) a NKR-P1B (vpravo) izolovaných na koloně Q-Sepharose (obr. 5) gelovou chromatografií na sloupci Superdexu 200 HR. Proteiny byly po přečištění na Q-Sepharose zakoncentrovány a naneseny v objemu cca 100 μ l na kolonu Superdex 200 HR o rozměrech 1 x 30 cm. Eluce proteinů byla sledována při 280 nm (citlivost 1 AUFS). Oba proteiny byly z kolony eluovány ve formě monodisperzního píku odpovídajícímu dimernímu proteinu (asi 30 kDa). U takto připravených proteinů byl minimální obsah agregátů (eluční čas 15. – 20. min). Frakce byly odebírány po 1 min.

Ověření homogenity proteinového preparátu SDS elektroforesou

Ověření homogenity preparátu NKR-P1A bylo provedeno SDS elektroforesou za redukujících a neredukujících podmínek. Redukující podmínky byly zajištěny považením vzorků s DTT. Za neredukujících podmínek je posun vzorků zřetelnější, elektroforetická mobilita proteinu je tedy za těchto podmínek vyšší. Je způsobena větší kompaktností molekuly, která je zesíťována disulfidovými můstky.

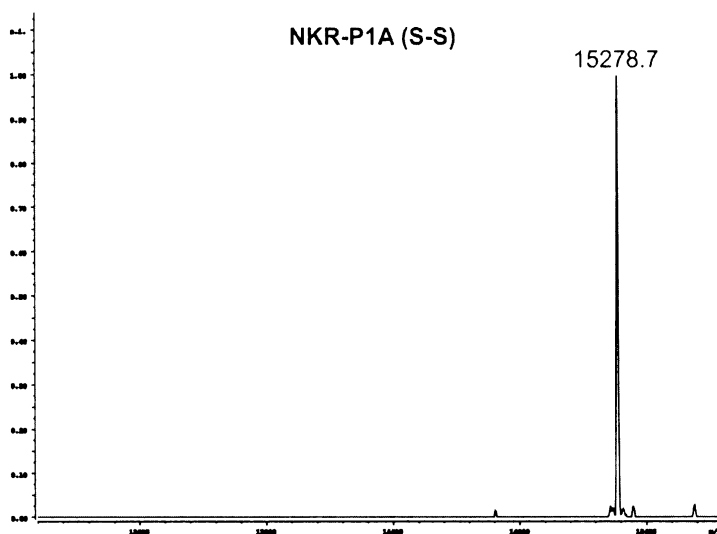


Obr. 7.: Analýza frakcí NKR-P1A proteinu SDS elektroforesou v 15% polyakrylamidovém gelu za redukujících (vlevo) a neredukujících (vpravo) podmínek. Analyzovány byly 4 různé frakce odpovídající monodisperznímu píku po gelové filtraci (obr. 6, vlevo). Marker molekulových hmotností obsahoval 5 proteinů: hovězí sérový albumin (65 kDa), ovalbumin (44 kDa), carbonic anhydrasu (30 kDa), sojový inhibitor trypsinu (20 kDa) a lysozym (14 kDa). Jakoby dvojitý vzhled separovaných zón proteinů vznikl při focení gelu.

Ověření homogenity proteinového preparátu hmotnostní spektrometrií

Analýza hmotnostního spektra byla provedena na FT-MS analyzátoru s iontově cyklotronovou rezonancí. Touto metodou lze dosáhnout velké přesnosti, chyba je menší než 0,01 Da. Měření byla prováděna specializovaným operátorem hmotnostního spektrometru Mgr. Petrem Pompachem PhD.

Získaná hmota poskládaného proteinu 15278,7 Da odpovídá nativní hmotě proteinu, obsahující tři disulfidové můstky a methionin na N-terminálním konci.



Obr. 8.: Spektrum NKR-P1A měřené FT-MS hmotnostní spektrometrií na analyzátoru s iontově cyklotronovou rezonancí, získané dekonvolucí spektra píků různě nabitých molekul proteinu. Potvrzuje intaktnost molekuly poskládaného proteinu včetně správného uzavření disulfidových můstků.

5 Diskuse

Aktivační receptor NKR-P1 potkana je již od svého objevu v roce 1989 považován za jeden z nejdůležitějších receptorů odpovědných za aktivaci přirozených zabíječských buněk u hlodavců. I po objevu dalších izoform tohoto receptoru, NKR-P1B, NKR-P1D, a nedávno NKR-P1C, zůstává jeho tradičně studovaná forma NKR-P1A kvantitativně nejvýznamnější formou. Z hlediska identifikace ligandů pro jednotlivé izoformy receptorů NKR-P1 jsou zajímavé údaje ze studie Plíhala a kol.¹¹ Uvádí zde, že zatímco aktivující izoforma NKR-P1A i inhibující izoforma NKR-P1B jsou obě schopné vázat spektrum monosacharidů s přibližně stejnou afinitou, pouze NKR-P1A je schopná účinně vázat vysokoafinitní formy sacharidových ligandů, jako jsou sacharidové dendrimery a jiná glykomimetika. Pokračující ligandové identifikační studie prováděné v laboratoři prof. Bezoušky, používající v poslední době velmi pokročilé experimentální techniky (spektrální metody, proteinová krystalizace, NMR titrační experimenty), vyžadují neustálý přísun vysoce purifikovaných a velmi stabilních rozpustných NKR-P1A a NKR-P1B receptorů. Právě přípravě těchto proteinů jsem věnovala svoji bakalářskou práci.

Důkladná optimalizace protokolů pro přípravu rozpustných forem NKR-P1 receptorů nebyla dosud prováděna. V Laboratoři architektury proteinů na MBÚ AV ČR byly od počátku 90. let minulého století používány postupy založené na přípravě fúzních proteinů s bakteriálním proteinem specifickým pro maltosu, štěpení fúzního proteinu, denuraci a následném poskládání cílového receptoru pomocí dialýzy. Přestože tyto protokoly vedly k tvorbě biologicky (vazebně) aktivních receptorů, nebylo možné získat dostatečná množství stabilních proteinů potřebná pro strukturní studie. Ve své bakalářské práci jsem proto využila postup podle Kogelbergové a spol., která pro přípravu NKR-P1 proteinu použila přikapávání roztoku denaturovaného proteinu do renaturačního pufu. Ten obsahoval jako nízkomolekulární chaperon L-arginin a mimo jiné také redukovaný a oxidovaný glutathion.¹⁴ Ve své práci jsem se zabývala další optimalizací tohoto protokolu.

Při skládání NKR-P1A podle prvního protokolu se ukázalo, že prostředí Ca^{2+} má na výtěžnost správně poskládaného proteinu lepší účinky než prostředí EDTA. Již dříve přitom bylo prokázáno, že přítomnost vysokých koncentrací vápenatých iontů je pro

vazebnou aktivitu NKR-P1 receptoru nezbytná. V dalších protokolech jsem tedy využívala přídavek CaCl_2 do renaturačního pufru a jeho koncentraci jsem zvýšila. Jak ukázal refolding III., vyšší koncentrace Ca^{2+} má pozitivní vliv na správné poskládání proteinu. Když byla koncentrace Ca^{2+} v protokolu III. nižší než v protokolu II., zvýšil se objem agregovaného proteinu a snížil objem proteinu správně poskládaného. Koncentrace L-argininu má pozitivnější vliv v koncentraci 1 M, než v 0,5 M. Přestože je L-arginin látka velmi drahá, jeví se jeho přítomnost v 1 M koncentraci při skládání NKR-P1A a NKR-P1B jako nezbytná.

Důležitým krokem se zdá být přidávání roztoku proteinu do renaturačního pufru před dialýzou. Je vhodné mít pufr dostatečně vychlazen a promíchán. Přikapávat by se měl protein po velmi malých objemech a za neustálého míchání pufru, čímž umožníme dokonalejší poskládání proteinu. Významné je pro tvorbu nativního a dobře poskládaného proteinu také přidání proteinas do renaturačního pufru.

Místo fyziologicky mnohem vhodnějšího glutathionu v oxidované a redukované formě jsem se v protokolu IV. rozhodla z finančních důvodů použít cystamin a cysteamin. Ukázalo se, že tato záměna nemá na poskládání viditelný vliv. Proto je při realizaci dalších refoldingů možno použít cystamin a cysteamin bez obav z možnosti horších výsledků.

Při použití optimalizovaného protokolu IV. se podařilo získat asi 1 mg stabilního a dobře poskládaného rozpustného receptoru NKR-P1A, u receptoru NKR-P1B byly výtěžky asi o polovinu nižší. Gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 potvrdila monodisperzitu získaného preparátu. Ten obsahoval jen minimální množství agregátů a nespecifických oligomerů. Tato metoda také umožnila provést odhad nativní molekulové hmotnosti exprimovaných receptorů. Tyto se za nativních podmínek překvapivě chovaly jako dimery o relativní molekulové hmotnosti větší než 30 kDa. Přesto lze na SDS elektroforeze pozorovat proteinovou podjednotku o velikosti 20 kDa. Tento údaj je v rozporu s velmi přesnými měřeními pomocí hmotnostní spektrometrie s iontově cyklotronovou resonancí. Pravděpodobně souvisí s abnormální mobilitou při SDS elektroforese, která je u některých proteinů pozorována. Pokud byla SDS elektroforeza prováděna za neredukujících podmínek, vykazovaly molekuly proteinu výrazně vyšší mobilitu. Za těchto podmínek se molekula receptoru nachází v kompaktnějším uspořádání, udržovaném pomocí disulfidových „zesíťování“. I za

těchto podmínek je zóna separovaného proteinu homogenní, což spolu s velmi přesnými údaji hmotnostní spektrometrie potvrzuje správné uzavření všech tří disulfidových můstků v molekule NKR-P1 receptorů.

Na základě výsledků experimentů skládání a purifikace proteinů NKR-P1A a NKR-P1B jsem vyhodnotila nejvhodnější podmínky a postupy. Vytvořila jsem tak protokol vhodný zejména pro NKR-P1A. Protein NKR-P1B lze také skládat tímto postupem, výtěžnost je ale mnohem menší než v případě NKR-P1A. Proto by bylo vhodné, aby byl pro tento membránový receptor protokol skládání dále optimalizován. Připravené proteiny se ukázaly jako stabilní v dlouhodobých biochemických testech při inkubacích na 30 a 37 °C. Při uchování v lednici při 4 °C je jejich stabilita také velmi dobrá. Ukazují se tedy jako vhodné nejen pro ligandové identifikační studie, ale i pro strukturální experimenty jako je proteinová krystalizace a NMR.

6 Výsledky

- Byl optimalizován protokol pro skládání rekombinantních receptorů přirozených zabiječských buněk potkana NKR-P1A a NKR-P1B.
- Byly připraveny stabilní preparáty s dobrými výtěžky, které byly přečištěny kombinací chromatografií na ionexových a gelových permeačních kolonách.
- V nativním prostředí se rozpustné receptory jeví jako nekovalentní dimery, obsahují tři disulfidové můstky. Během jejich přípravy nedocházelo k jejich degradaci ani kontaminaci jinými proteiny.
- Protokoly optimalizované v mé bakalářské práci jsou dále využívány v Laboratoři architektury proteinů MBÚ AV ČR pro ligandové identifikační experimenty a strukturní studie s použitím proteinové krystalografie a vícedimenzionálních NMR technik.

7 Použitá literatura

1. Fučíková, T. a kolektiv: *Základy klinické imunologie*, RDI Press Praha (1994)
2. Giorda, R., Rudent, W. A., Vavassoni, C., Chambers, W. H., Hiserodt, K., Trucco, M.: *Science* **249**, 1298-1300 (1990)
3. Saksela, E., Timonen, T., Rannki, A., Häyry, P.: *Immunol. Rev.* **44**, 71 (1979)
4. Lanier, L. L., Spits, H., Phillips, J. H.: *Immunol. Tod.* **13**, 392 (1992)
5. Bezouška, K.: Carbohydrate and non-carbohydrate ligands for the C-type lectin-like receptors of natural killer cells a review, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **69** 535-563 (2004)
6. Šterzl, J.: *Imunitní systém a jeho fyziologické funkce*, Česká imunologická společnost Praha (1993)
7. Yokoyama, W. M., Ryan, J. C., Hunter, J. J., Smith, H. R. C., Stark M., Seaman, W. E.: *J. Immunol.* **147**, 3229-3236 (1991)
8. Ryan, J.C., Niemi, E.C., Goldfien, R.D., Hiserodt, J.C., Seaman, W.E.: *J. Immunol.* **147**, 3244-50 (1991)
9. Ryan, J. C., Turc, J., Niemi, E. C., Yokoyama, W. M., Seaman, W. E.: *J. Immunol.* **149**, 1631 (1992)
10. Vicari, A. P., Zlotnik, A.: *Immunol. Today* **17**, 71 – 76 (1996)
11. Plíhal, O., Byrtusová, P., Pavlíček, J., Mihók, L., Ettrich, R., Man, P., Pompach, P., Havlíček, V., Hušáková, L., Bezouška, K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **69** 631-644 (2004)
12. Ljutic, B., Carlyle, J. R., Zúñiga-Pflücker, J. C.: *J. Biol. Chem.*,; **278**, 31909 – 31917 (2003)
13. Bezouška, K., Vlahas, G., Horváth, O., Jinochová, G., Fišerová, A., Giorda, R., Chambers, W. H., Feizi, T., Pospíšil, M.: *J. Biol. Chem.* **269**, 16945-16952 (1994)
14. Kogelberg, H., Frenkiel, T. A., Birdsall, B., Chai, W., Muskett, F. W.: *ChemBioChem* **3**, 1072-1077 (2002)
15. Ryan, J.C., Naper, C., Hayashi, S., Daws, M.R.: *Immunol. Rev.* **181**, 126-137 (2001)