

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



**Příprava výchozího konstruktů pro produkci
lymfocytárního receptoru LLT1**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.
Školitel - konzultant: Mgr. Ľuboslav Mihók

PRAHA 2007

BRANISLAV SLÁVIK

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 20. 7. 2007



.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych se poděkovat mému školiteli Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu poskytnout pomoc, cenné rady a připomínky. Rád bych také poděkoval zbytku kolektivu jeho laboratoře a to zejména Mgr. Danielu Kavanovi za jeho podporu, nápady a připomínky ohledně chodu laboratoře. Velké díky patří také mým rodičům, bez jejichž podpory po celou dobu mého studia by tato práce pravděpodobně nevznikla.

OBSAH

Obsah	1
Seznam zkratek	3
Předmluva	5
1. Přehled literatury	6
1.1 Imunitní systém, diferenciace buněk imunitního systému	6
1.2 Hlavní histokompatibilní komplex (MHC)	7
1.2.1 Molekuly MHC I. typu	8
1.2.2 Molekuly MHC II. typu	8
1.3 Buňky lymfoidní linie interagující s MHC	9
1.3.1 T lymfocyty	9
1.3.2 NK buňky: definice, hlavní cytotoxické mechanismy	10
1.4 Receptory NK buněk	11
1.4.1 Mechanismus působení inhibičních a aktivačních receptorů	11
1.4.2 Geny pro NK receptory a jejich komplexy	12
1.4.3 Významné rodiny NK receptorů	13
1.4.3.1 Rodina KIR	13
1.4.3.2 Rodina Ly49	13
1.4.3.3 Rodina NKG-2	14
1.4.3.4 Rodina NKR-P1	15
1.4.3.5 Rodina molekul příbuzných s CD69	16
1.5 Lidský receptor LLT1	16
2. Cíl práce	19
3. Materiál	20
3.1 Přístroje	20
3.2 Chemikálie	20
3.3 Enzymy	21
3.4 Vektory	21
3.5 Primery	22
3.6 Bakteriální kmeny	22
3.7 Směs buněk použitá na izolaci RNA	22
3.8 Média	22

3.9 Roztoky a pufry	22
4. Metody	24
4.1 Izolace RNA	24
4.2 Reverzně transkriptasová PCR (RT-PCR)	24
4.2.1 Syntéza cDNA	24
4.2.2 PCR amplifikace cDNA fragmentu	25
4.3 Elektroforéza v agarosovém gelu	25
4.4 Izolace a purifikace fragmentů DNA z agarosového gelu	26
4.5 Ligace - spojení fragmentů DNA	26
4.5.1 Ligace fragmentů DNA s tupými konci	26
4.5.2 Ligace fragmentů DNA s komplementárními konci	27
4.6 Příprava kompetentních buněk	27
4.7 Transformace kompetentních buněk	27
4.8 Selektce klonů a očkování tekutých médií	28
4.9 Minipreparativní izolace plasmidové DNA	28
4.9.1 Minipreparativní izolace plasmidové DNA lyzačním pufrem	28
4.9.2 Minipreparativní izolace plasmidové DNA na komerčním nosiči	29
4.10 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami	29
4.11 Maxipreparace plasmidové DNA	30
4.12 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	31
4.13 Automatické sekvenování DNA	32
5. Výsledky	32
5.1 Izolace RNA a RT-PCR	32
5.2 Příprava konstruktů pBSLLT1	33
6. Diskuse	35
7. Souhrn	36
8. Seznam použité literatury	37
9. Přílohy	39

SEZNAM ZKRATEK

ADCC	cytotoxická reakce založená na protilátkách („ Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity “)
AICL	aktivací indukovaný lektin C typu („ Activation-Induced C-type Lectin “)
APC	antigen prezentující buňka („ Antigen-Presenting Cell “)
cDNA	komplementární DNA („ complementary DNA “)
Clr	molekula příbuzná lektinům C typu („ C-type lectin related “)
CTL	cytotoxický T lymfocyt („ Cytotoxic T Lymphocyte “)
CTLD	doména podobná lektinům C typu („ C-Type Lectin-like Domain “)
DAP-10	DNAX-aktivující protein 10 kDa („ DNAX-activating protein of 10 kDa “)
DAP-12	DNAX-aktivující protein 12 kDa („ DNAX-activating protein of 12 kDa “)
dsDNA	dvojvláknová DNA („ double stranded DNA “)
EDTA	kyselina ethylendiamin tetraoctová („ Ethylenediamine tetraacetic acid “)
EST	„ Expressed Sequence Tag “
FcεRIγ	Receptor pro Fc fragment IgE, vysoká afinita I, gamma polypeptid
H60	protein vedlejšího histokompatibilního komplexu
HLA	hlavní lidský (histokompatibilní) antigen („ Human Leukocyte Antigen “)
IFN	interferon
IgG	imunoglobulin G
IgSF	imunoglobulinová superrodina („ Immunoglobulin superfamily “)
IL	interleukin
IPTG	isopropyl-β-D-galaktopyranosid
ITAM	imunitní aktivační receptorový motiv tyrosinového typu („ Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif “)
ITIM	imunitní inhibiční receptorový motiv tyrosinového typu („ Immunoreceptor Tyrosin-based Ihibition Motif “)
KIR	zabíječský receptor imunoglobulinového typu („ Killer cell Immunoglobulin-like Receptors “)
LAIR	s leukocyty spojené imunoglobulinům podobné receptory („ Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptors “)

LILR (LIR)	imunoglobulinům podobné receptory leukocytů („Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors“)
LLT1	lektinům podobný transkript 1 („Lectin-like transcript 1“)
LRC	komplex receptorů leukocytů („Leukocyte Receptor Complex“)
M	mol.dm ⁻³
mAb	monoklonální protilátka („monoclonal Antibody“)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex („Major Histocompatibility Complex“)
MIC	neklasické MHC molekuly příbuzné molekulám MHC I. typu („MHC class I-related“)
MULT1	myší ULBP podobný transkript 1 („Murine ULBP-like transcript“)
NK	přirozený zabíječ („Natural Killer“)
NKC	komplex receptorů NK („Natural Killer Complex“)
NKR-P	protein receptoru NK buňky („Natural Killer cell Receptor Protein“)
OD	optická denzita
PCR	polymerasová řetězová reakce („Polymerase Chain Reaction“)
PI3K	fosfatidyl inositol 3-kinasa
PLC-γ	fosfolipasa C gama
RAE-1	(„Retinoic Acid Early transcript 1“)
RT-PCR	reverzně transkriptázová PCR („Reverse Transcription PCR“)
SHIP	inositol polyfosfát 5' fosfatasa obsahující SH2 doménu („SH2-domain-containing polyphosphate 5' Phosphatase“)
SHP	tyrosinová fosfatasa obsahující SH2 doménu („SH2-domain-containing tyrosin phosphatase“)
Syk	proteinová tyrosinová kinasa
TCR	receptor T lymfocytů („T-Cell Receptor“)
T _H	pomocný T lymfocyt („Helper T Cell“)
T _C	prekurzor cytotoxických T lymfocytů („Cytotoxic T cell precursor“)
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol („trishydroxymethylaminomethane“)
ULBP	UL16 vázající protein („UL16-binding protein“)
Vav1	onkogen Vav1
X-Gal	5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid
ZAP70	protein asociován se ζ řetězcem 70kDa („ζ-chain Associated Protein 70 kDa“)

PŘEDMLUVA

NK buňky tvořící třetí hlavní subpopulaci lymfocytů byly definovány na základě jejich schopnosti zabít některé nádorové cílové buňky bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciaci procesem zvaným přirozené zabíjení. V mnoha aspektech se podobají T buňkám, se kterými sdílejí společného progenitora a některé zabíjecí mechanismy. Klíčovým aspektem v rozeznávání vhodných cílových buněk je kontrola exprese molekul MHC I. třídy prostřednictvím specifických receptorů exprimovaných na jejich buněčném povrchu. Jedním z těchto receptorů je receptor LLT1, který si v poslední době získal pozornost vědců po jeho charakterizaci jakožto ligandu pro lidský receptor C-lektinového typu NKR-P1A (CD161). Tato skutečnost a bioinformatické studie porovnáváním různých genových komplexů vedla k hypotéze, že NK genový komplex a MHC genový komplex se vyvinuly ze společného původního regionu. Přesto však o jeho funkci, struktuře a ligandech není až tolik známo.

Prvním krokem k objasnění aspoň některých tajů tohoto receptoru by mohla být právě tato bakalářská práce. Jejím cílem bylo připravit vhodné expresní rekombinantní plasmidy, které by kódovaly různé extracelulární části receptoru LLT1, které by po renaturaci a purifikaci mohly sloužit ke studiu vazebných a strukturních poměrů.

1. PŘEHLED LITERATURY

1.1 Imunitní systém, diferenciacce buněk imunitního systému

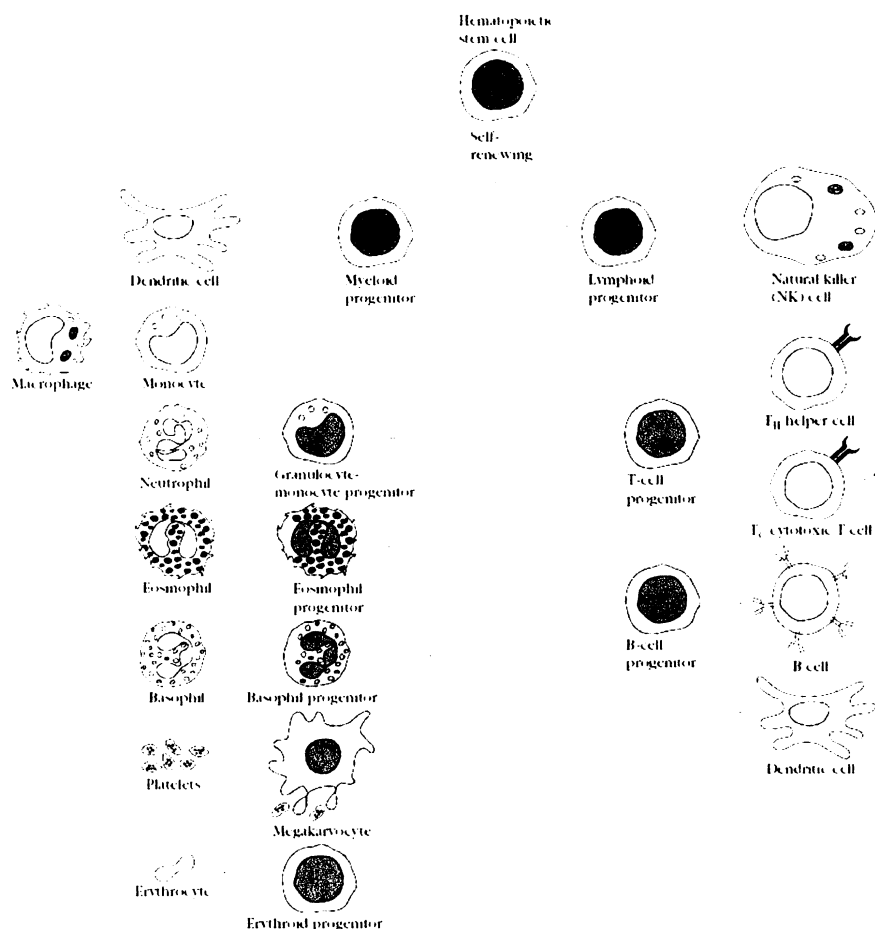
Imunitní systém patří mezi nejdůležitější homeostatické mechanismy organismu. Jeho základní funkcí je rozpoznávat škodlivé od neškodného a chránit organismus před škodlivinami z vnějšího i vnitřního prostředí. Tato funkce se projevuje jako:

- 1.) obranyschopnost – imunitní systém rozpoznává škodliviny z vnějšího prostředí a chrání tak organismus například před patogenními mikroorganismy a jejich toxickými produkty
- 2.) autotolerance – imunitní systém rozpoznává vlastní tkáň organismu a udržuje vůči nim toleranci
- 3.) imunitní dohled – imunitní systém rozpoznává škodliviny z vnitřního prostředí, tj. průběžně odstraňuje staré, poškozené a některé pozměněné (mutované) buňky [1].

Hlavní komponentu imunitního systému tvoří buňky imunitního systému (imunocyty). Všechny krevní buňky vznikají procesem hematopoese z pluripotentních kmenových buněk nacházejících se v kostní dřeni. Z těchto kmenových buněk vznikají dvě základní linie: myeloidní a lymfoidní (str. 7 obr. 1). V průběhu vývoje těchto linií se kmenové buňky diferencují na progenitorové buňky, které ztrácejí schopnost dělení a sebeobnovování.

Z lymfoidních progenitorových buněk vznikají B, T a NK buňky a část dendritických buněk. Vývin B lymfocytů probíhá u lidí v kostní dřeni a dokončuje se po střetnutí s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. Konečným diferenciačním stádiem B lymfocytů jsou plasmatické buňky, které produkují protilátky. Hlavní část vývinu T lymfocytů probíhá v thymu, kde vznikají prekurzory pomocných T buněk (T_H), pro které je charakteristický povrchový receptor CD4, a prekurzory cytotoxických T buněk (T_C), které mají namísto CD4 receptor CD8 [1].

Progenitorové buňky myeloidní linie se mění na progenitory červených krvinek (erythrocytů), různých bílých krvinek (neutrofilů, eosinofilů, basofilů, monocytů), krevních destiček a dendritických buněk. Další činnost těchto progenitorů závisí na jejich odpovědi na specifické růstové faktory a cytokiny. Když jsou přítomné, progenitorové buňky proliferují a diferencují na odpovídající buněčný typ: erythrocyt, konkrétní typ leukocytů, megakaryocyt (krevní destičky generující buňka) a dendritické buňky [2].



Obr. 1. Diferenciace různých druhů imunocytů z kmenové buňky Převzato z [2].

1.2 Hlavní histokompatibilní komplex (MHC) [2]

Hlavní histokompatibilní komplex je skupina genů, kterých produkty hrají úlohu v mezibuněčném rozeznávání a odlišování vlastního od cizího. Většina T buněk rozeznává antigen jedině tehdy, je-li v kombinaci s molekulou MHC, co znamená, že molekuly MHC slouží pro ně jako antigen prezentující struktury. Konkrétní sada MHC molekul tedy ovlivňuje repertoár antigenů na které můžou odpovídat T_H a T_C buňky. Z tohoto důvodu MHC molekuly částečně determinují odpověď jedince na antigeny infekčních organismů a vývoj autoimunity jedince. NK buňky exprimují receptory pro MHC molekuly I. typu a fakt, že interakce receptor-MHC častokrát vede k jejich inhibici nebo aktivaci, ještě víc rozšiřuje úlohu této rodiny genů.

U lidí je MHC nazýván HLA komplex a nachází se na chromosomu 6 a u myši je označován jako H-2 komplex a je umístěný na chromosomu 17. I když je uspořádání genů kousek odlišné, v obou případech je MHC organizován do oblastí kódujících 2 hlavní typy molekul MHC.

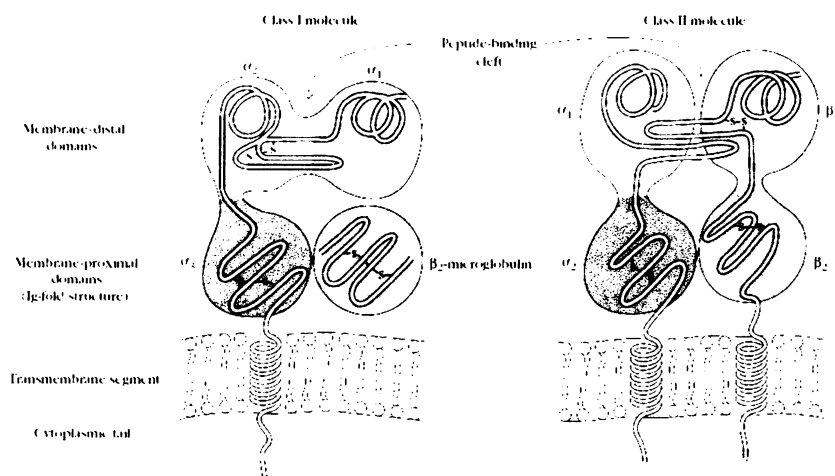
1.2.1 Molekuly MHC I. typu

Molekula MHC I. typu se skládá z řetězce α nekovalentně vázaného s molekulou β_2 -mikroglobulinu. α řetězec je transmembránový glykoprotein složený ze 3 externích domén, transmembránové domény, a cytoplasmatické kotvy. β_2 -mikroglobulin je protein kódovaný vysoce konzervovaným genem na jiném chromosomu, který je nutný k expresi molekul I. typu na buněčných membránách (obr. 2). Na horním povrchu domén α_1 a α_2 se nachází peptid-vázací rýha („peptide-binding cleft“), ve které bývá vázán antigen nebo vlastní protein o délce 8-10 aminokyselin.

Prostřednictvím těchto molekul se prezentují antigeny endogenně zpracované buňkou (str. 9 obr. 3b).

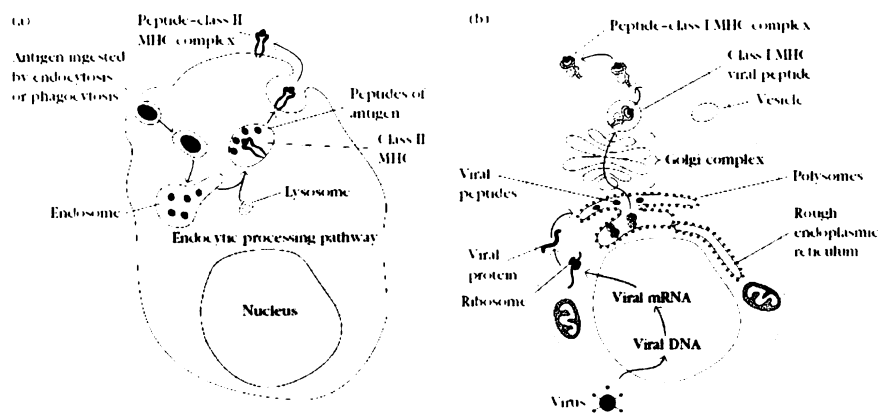
1.2.2 Molekuly MHC II. typu

Molekula MHC II. typu se skládá ze dvou různých nekovalentně vázaných glykoproteinových řetězců α a β . Každý z nich je složen z 2 domén, distální a proximální k membráně. Podobně jako u molekul I. typu domény proximální k membráně mají sekvenční podobnost se strukturou imunoglobulinového sbalení („immunoglobulin-fold structure“). Membránově distální část taky vytváří peptid-vázací rýhu (obr. 2).



Obr. 2. Schematické znázornění typů molekul MHC. Převzato z [2].

Tyto molekuly prezentují exogenní antigeny zpracované buňkou endocytosou, nebo fagocytosou (str. 9 obr. 3a).



Obr. 3. Zpracování a prezentace a) exogenních b) endogenních antigenů. Převzato z [2].

1.3 Buňky lymfoidní linie interagující s MHC

Mezi nejvýznamnější skupiny buněk interagující s molekulami MHC patří zejména T lymfocyty a NK buňky. Po interakci u nich nastává aktivace a mění se na efektorové buňky nebo zprostředkují přenos signálu na další imunocyty.

1.3.1 T lymfocyty [2]

Jejich název je odvozen podle místa jejich dozrávání - thymu. Na svém povrchu exprimují pro ně specifické receptory TCR, komplex polypeptidů obsahující CD3 a jeden z receptorů CD4 nebo CD8, které odlišují jejich jednotlivé subpopulace.

Ve všeobecnosti exprese CD4 nebo CD8 definuje 2 hlavní subpopulace T lymfocytů:

- 1.) $CD4^+$ buňky slouží jako pomocné („T helper“) T_H buňky a jsou většinou omezené na molekuly MHC II. typu
- 2.) $CD8^+$ buňky slouží jako cytotoxické T_C a jsou většinou omezené na molekuly MHC I. typu.

T_H buňky jsou aktivovány interakcí s komplexem antigen-molekula MHC II. typu na APC. Po aktivaci se začínají dělit a vznikají z nich klony efektorových buněk specifických vůči danému komplexu antigen-molekula MHC II. typu. T_H buňky produkují cytokiny, které následně aktivují další buňky participující v imunitní odpovědi.

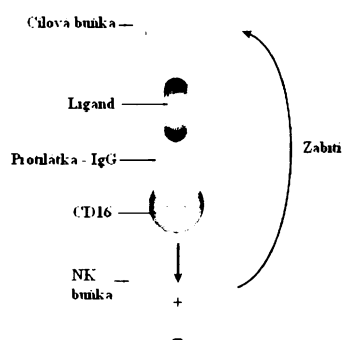
T_C buňky jsou aktivovány interakcí s komplexem antigen-molekula MHC I. typu na površích změněných tělu vlastních buněk (nádorové buňky nebo virem infikované buňky) za přítomnosti vhodných cytokinů. T_C buňky pak diferencují na efektorové buňky zvané

cytotoxické T lymfocyty (CTL). Na rozdíl od T_H buněk většina CTL vylučuje málo cytokinů, namísto toho však nabývají schopnost rozpoznávat a eliminovat změněné tělu vlastní buňky.

1.3.2 NK buňky: definice, hlavní cytotoxické mechanismy

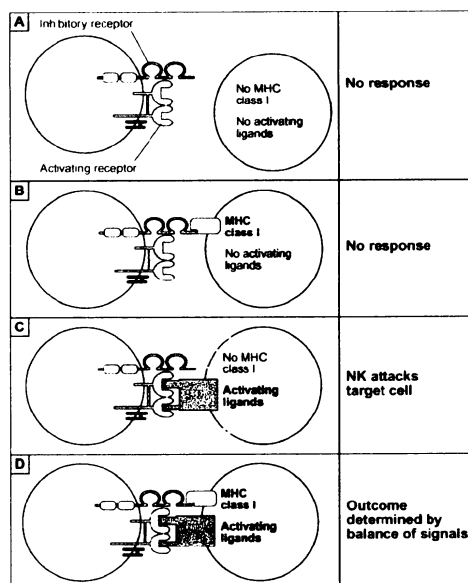
NK buňky jsou definovány jako spontánně cytotoxické velké granulární lymfocyty, které na svém povrchu exprimují receptor pro Fc část IgG CD16, neutrální adhezní molekulu CD56, neexprimují receptor T buněk TCR a jsou schopné zabít některé nádorové a viry infikované buňky [3].

NK buňky rozpoznávají buňky opsonizované protilátkami IgG díky interakci Fc části IgG s receptorem CD16, která způsobuje agregaci receptorů a přenos signálu, který aktivuje cytotoxické mechanismy. Tento děj se nazývá cytotoxická reakce závislá na protilátkách označovaná ADCC (obr. 4).



Obr. 4. Znárodnění ADCC. Převzato ze [4].

Na povrchu NK buněk se nacházejí receptory regulující jejich aktivitu. Aktivační receptory stimulují NK buňku k použití cytotoxických mechanismů, inhibiční receptory je naopak inhibují. Výsledná reakce NK buňky po setkání s jinou buňkou závisí na tom, převáželi aktivační anebo inhibiční signály (str. 11 obr. 5).



Obr. 5. Reakce NK buňky (růžově) na signály z povrchových receptorů. Převzato z [5].

Když interakce s transformovanými cílovými buňkami nebo s buňkami nakaženými určitým virem vyvolá převahu aktivačních signálů, NK buňky reagují uvolněním cytotoxických granulí obsahujících perforin a granzymy do úzké štěrbině mezi oběma buňkami často označované jako imunologická synapse. Perforin je monomerní, Ca^{2+} dependentní protein schopný vytvářet homopolymerní cirkulární póry o průměru 16 nm. V některých případech mohou tyto póry úplně proděravět membránu a způsobit smrt buňky osmotickou lýzou. Většinou však tyto póry slouží k tomu, aby se přes ně dostaly do cílové buňky granzymy. Granzymy jsou serinové proteasy, které štěpí různé substráty, čímž dojde ke spuštění signalizačních kaskád, které vedou k apoptické smrti cílové buňky [2].

1.4 Receptory NK buněk

1.4.1 Mechanismus působení inhibičních a aktivačních receptorů

Většina dosud známých inhibičních receptorů má v cytoplasmatické doméně jednu nebo více kopií sekvence Ile/Val/Leu/Ser-x-Tyr-x-x-Leu/Val, kde x označuje libovolnou aminokyselinu, zvanou ITIM motiv. Po navázání ligandu na receptor je tyrosinový zbytek ITIM motivu fosforylován pravděpodobně kinasou Src rodiny. Aktivují se fosfatasy SHP-1 a SHP-2 nebo SHIP pracující v membránově proximální oblasti, které snižují míru fosforylace různých intracelulárních signálních proteinů (zejména $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\gamma$, ZAP70, Syk, Vav1) [5].

Stimulační receptory jsou charakteristické krátkou cytoplasmatickou doménou bez signál přenášejících prvků. Jejich transmembránová část většinou obsahuje nabitě zbytky,

prostřednictvím kterých asociují s adaptorovými proteiny, které jsou často potřebné pro jejich optimální povrchovou expresi [4]. Nejvýznamnější adaptorové proteiny jsou DAP-12, FcεRIγ, CD3ζ, které obsahují sekvenci Asp/Glu-x-x-Tyr-x-x-Leu-Ile-x₆₋₈-Tyr-x-x-Leu/Ile zvanou ITAM motiv, a DAP-10 obsahující sekvenci Tyr-x-x-Met známou jako YxxM motiv. Navázání ligandu na receptory asociující s adaptory signalizujícími prostřednictvím ITAM motivů vede k fosforylaci tyrosinů v ITAM a aktivaci protein tyrosin kinas Syk nebo ZAP70. Tyto signály se přenášejí na další regulátory PLC-γ, PI3K, Erk, Vav1 [6,7,8]. Receptory asociující s adaptorem DAP-10 vedou k fosforylaci a aktivaci p85 podjednotky PI3K. Další přenos signálu zahrnuje proteiny Vav1, GTPasy rodiny Rho a PLC [6,9,10].

V roce 2003 Stebbins et al. navrhli model aktivace cytotoxicity NK buněk. Podle tohoto modelu vede navázání ligandu na aktivační receptor výše popsanými dráhami k fosforylaci tyrosinu proteinu Vav1 a následně Vav1-dependentnímu přeuspořádání aktinových vláken cytoskeletu, které vytvoří stabilní imunologickou synapsi. Defosforylace Vav1 vyvolaná přenosem signálu z inhibičních receptorů naopak vyvolává zánik včasné NK buněčné imunologické synapse [11].

1.4.2 Geny pro NK receptory a jejich komplexy

Geny kódující NK receptory jsou uspořádány do dvou hlavních skupin: komplexu receptorů leukocytů („leukocyte receptor complex“) LRC a komplexu receptorů NK („natural killer complex“) NKC. Lineární srovnání genů LRC a NKC je uvedeno v příloze.

Geny LRC se u lidí nacházejí na chromosomu 19q13.4 [12], u myši na chromosomu 7 a u potkanů na chromosomu 1 [13]. LRC kóduje receptory imunoglobulinové superrodiny (IgSF), které jsou uspořádány do genových rodin v závislosti na organizaci genů, fylogenesi a struktuře. Nejvýznamnějšími z těchto rodin jsou imunoglobulinům podobné receptory zabíjecích buněk („killer cell immunoglobulin-like receptors“) KIR, imunoglobulinům podobné receptory leukocytů („leukocyte immunoglobulin-like receptors“) označované LILR nebo LIR a s leukocyty spojené imunoglobulinům podobné receptory („leukocyte-associated immunoglobulin-like receptors“) LAIR [14].

Geny NKC se u lidí nacházejí na chromosomu 12p12.3-12p13.1, u myši na chromosomu 6 a u potkanů na chromosomu 4. NKC kóduje většinou disulfidicky spojené dimerní transmembránové receptory II. typu (N-konec je lokalizovaný v cytoplasmě) homologní s lektiny C-typu [5, 14]. Mezi nejvýznamnější rodiny receptorů NKC patří rodina Ly49, rodina NKG-2, rodina NKR-P1 a rodina receptorů příbuzných s CD69.

1.4.3 Významné rodiny NK receptorů

1.4.3.1 Rodina KIR

Klíčovými LRC geny řídícími rozeznávání molekul MHC I. typu NK buňkami jsou geny pro KIR. Jsou to transmembránové glykoproteiny I. typu (N-konec je lokalizovaný extracelulárně) se dvěma imunoglobulinům podobnými doménami v extracelulární oblasti označované jako KIR2D nebo se třemi označované jako KIR3D. Imunoglobulinům podobné domény byly označeny D0, D1 a D2, kde D0 je doména nejbližší k N-terminálnímu konci v KIR3D proteinech, následována D1 a D2 doménami. Krátká „stalk“ oblast odděluje jednotlivé domény od transmembránového segmentu a cytoplasmatické domény variabilních délek. Některé receptory mají dlouhou (L) cytoplasmatickou doménu s jedním nebo dvěma ITIM motivy (označují se KIR2DL nebo KIR3DL), jiné ji zase mají krátkou (S) bez ITIM motivů. KIR s krátkou cytoplasmatickou doménou (KIR2DS a KIR3DS) obsahují v transmembránové oblasti konzervovaný lysinový zbytek důležitý pro asociaci s adaptorovým proteinem DAP-12 [5].

Ve všeobecnosti KIR2D rozeznávají peptidy prezentované HLA-C, zatímco KIR3D rozeznávají peptidy prezentované HLA-A nebo HLA-B [6]. Na rozeznání ligandu je nutný neporušený trimer HLA I. typu složený z těžkého řetězce, β_2 -mikroglobulinu a peptidu. I když je rozeznávání peptid dependentní a peptid selektivní, tyto receptory nerozeznávají vlastní od cizích peptidů [5].

1.4.3.2 Rodina Ly49

Nejlépe charakterizovanou skupinou NKC genů jsou geny kódující rodinu Ly49. Genomická organizace genů Ly49 s extracelulárními ligand vázajícími doménami, transmembránovými a cytoplasmatickými segmenty kódovanými nezávislými exony poskytuje ideální uspořádání pro receptorovou diversifikaci [5]. Ta je nejlépe patrná u myši, u kterých bylo charakterizováno nejméně 24 genů a pseudogenů [6]. Naproti tomu u člověka, byl objeven jenom jeden pseudogen, který je transkribován, no bodová mutace zapříčiňuje vznik nefunkční molekuly [4, 14].

Podobně jako u rodiny receptorů KIR, i v této rodině se vyskytují inhibiční a aktivační varianty receptorů Ly49, které vážou myši MHC molekuly I. typu H-2. Navázání vyžaduje přítomnost peptidu vázaného v rýze molekuly H-2 [5]. Nejvýznamnější inhibiční varianty Ly49a, Ly49c, Ly49g a Ly49i v cytoplasmatické doméně obsahují ITIM motiv a aktivační varianty Ly49d a Ly49h pozitivně nabitý arginin v transmembránové doméně, který dovoluje

interakci s negativně nabitým zbytkem kyseliny asparagové adaptorového proteinu DAP-12 nesoucím ITAM motiv.

Podobná ligandová specifická, různý počet genů a charakter molekul KIR a Ly49 u různých druhů vedly k předpokladu, že jejich souhra v rozeznávání ligandů může být koordinována a dobře synchronizována avšak polarizované uspořádání u lidí (většina KIR, Ly49 nefunkční) a u myši (většina Ly49, KIR značně omezené na 2 geny mimo LRC) naznačuje, že existence obou sad u jednoho jedince zapříčiňuje logistické problémy, které byly vyřešeny vyřazením jedné sady. Na vyřešení těchto protichůdných názorů by však bylo potřeba další zkoumání u rozličných druhů [14].

1.4.3.3 Rodina NKG-2

Do této rodiny patří nejméně 6 receptorů označovaných NKG-2A až NKG-2F. Jsou to transmembránové proteiny II. typu, které (s výjimkou NKG-2D, který bude popsán níže) tvoří disulfidicky vázané heterodimery s molekulou CD94.

NKG-2A a její sestřihová varianta („splicing variant“) NKG2-B jsou inhibiční receptory obsahující v cytoplasmatické doméně ITIM motiv. NKG-2C a její sestřihová varianta NKG-2E jsou schopné díky lysinovému zbytku v transmembránové oblasti asociovat s proteinem DAP-12 a tak působit jako aktivační receptory [15]. Tyto receptory rozeznávají neklasické molekuly MHC I. typu (HLA-E u lidí a u myši Qa1^b) [16,17]. Podobně jako u rodin KIR a Ly49, inhibiční varianty vážou ligandy s vyšší afinitou než aktivační, ba navíc peptidy vázané na HLA-E nebo Qa1^b mohou různě vplývat na míru rozeznání inhibičními a aktivačními receptory [18,19,20]. Nejvíce vyskytující se peptidy v rýze těchto molekul jsou většinou odvozené od N-terminálních částí molekul MHC I. třídy HLA-A, -B, -C, -G u lidí a H-2 u myši. Je zjevné, že CD94/NKG-2 jsou tak schopné monitorovat stav klasických a jistých nekonvenčních proteinů MHC I. třídy v buňkách [5].

Molekula NKG-2F je unikátní, protože obsahuje nabytý transmembránový zbytek a doménu podobnou ITIM („ITIM-like domain“) a neobsahuje doménu podobnou lektinům C-typu („C-type lectin-like domain“) CTLD. Její funkce zatím není známá [14, 21].

Z této rodiny se podstatně vymyká NKG-2D, který tvoří disulfidicky vázané homodimery, je jen omezeně homologní s jinými molekulami NKG-2: 28% shoda aminokyselin lektinům podobné domény, zatímco ostatní molekuly NKG-2 jsou vysoce příbuzné a vykazují 70% shodu a neváže HLA-E nebo Qa1^b [4,22,23]. Alternativním sestřihem můžou vznikat 2 isoformy lišící se v přítomnosti nebo absenci 13 aminokyselin na N-konci cytoplasmatické

domény. Delší protein (NKG-2DL) výhradně asociuje s adaptorovým proteinem DAP-10, zatím co krátká forma (NKG-2DS) může asociovat buď s DAP-10 nebo DAP-12 [5].

NKG-2D rozeznávají molekuly příbuzné molekulám MHC I. typu, které nefungují jako peptid vázící struktury pro prezentaci antigenů T buňkám [24]. Nejvýznamnější lidské ligandy tohoto receptoru jsou MICA, MICB a proteiny ULBP1-ULBP4. U myši jsou to proteiny RAE-1 α až RAE-1 ϵ , H60 a MULT1. Složení extracelulární domény a typ zakotvení v membráně jednotlivých ligandů znázorňuje Tabulka 1 [6].

Tabulka 1.: Ligandy NKG-2D. Převzato z [6].

	Extracelulární domána	Membrane anchorage
Human		
MICA/MICB	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$	TM
ULBP1, 2, 3	$\gamma 1, \gamma 2$	GPI
ULBP4	$\gamma 1, \gamma 2$	TM
Mouse		
RAE1 γ - ϵ	$\gamma 1, \gamma 2$	GPI
H60	$\gamma 1, \gamma 2$	TM
MULT1	$\gamma 1, \gamma 2$	TM
MHC class I	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \beta 2m$	TM

TM-transmembránová doména, GPI- zakotvení glykosylfosfatidyl-inositolem

1.4.3.4 Rodina NKR-P1

Další významnou rodinou receptorů kódovanou NKC je rodina NKR-P1 pozůstávající z 5 členů NKR-P1A, NKR-P1B, NKR-P1C, NKR-P1D a NKR-P1F. U člověka se vyskytuje jenom gen pro formu NKR-P1A zatím co hlodavci mají několik genů kódující inhibiční (NKR-P1B a NKR-P1D) i aktivační varianty (NKR-P1C a NKR-P1F) [5,25]. Inhibiční varianty obsahují v cytoplasmatické doméně ITIM motiv, zatím co aktivační varianty mají ve své transmembránové oblasti nabytý zbytek, prostřednictvím kterého asociují s ITAM obsahujícím adaptorem Fc ϵ RI γ . O lidském NKR-P1A zatím není známo jak signalizuje protože neobsahuje ITIM motiv, ani nabitě aminokyseliny v transmembránové oblasti [5,25]. Nedávno bylo zjištěno, že někteří členové této rodiny interagují s molekulami příbuznými lektinům C typu („C-type lectin related“) Clr. Receptory NKR-P1B a D rozeznávají Clr-b a NKR-P1F asociuje s Clr-g [26,27]. Jako ligand pro receptor NKR-P1A byl nedávno objeven lidský ortholog myších Clr LLT1 s 43-48% homologií aminokyselinové sekvence [25,28].

Jelikož Clr jsou transmembránové proteiny II. typu superrodiny C-lektinů, zařazuje se rodina NKR-P1 ke „kostimulačním“ receptorům, zvyšujícím míru přenosu signálů z jiných nedefinovaných stimulačních receptorů raději než k nezávisle iniciujícím odpověď. Je

otázkou, jestli existuje nějaký práh nutný k překonání akce inhibičních NK receptorů simultánní souhrou několika „kostimulačních“ receptorů [5].

1.4.3.5 Rodina molekul příbuzných s CD69

V posledních letech byly identifikovány další molekuly kódované NKC: lidský lektinům podobný transkript 1 („lectin-like transcript 1“) LLT1, lidský aktivací indukovaný lektin C typu („activation-induced C-type lectin“) AICL a myši protein příbuzný C-lektinům („C-type related protein“) Clr [29,30,31]. Tyto molekuly tvoří další rodinu molekul příbuzných s CD69. Mezi jejich společné rysy nepatří jenom relativně vysoké míry homologie, ale taky to, že patří mezi molekuly široce rozšířené na periferních lymfocytech v raných stádiích aktivace a jsou těžko detekovatelné v nestimulovaných buňkách [32]. Fyziologické funkce CD69 a molekul jí příbuzných nejsou zatím moc známé [4].

1.5 Lidský receptor LLT1

V roce 1999 publikoval Boles a jeho kolegové v časopise Immunogenetics článek, kde ohlásili molekulární charakterizaci a chromozomální zmapování lidského lektinům podobného transkriptu 1 - LLT1 exprimovaném na NK, T a B buňkách a lokalizovaném v NKC v blízkosti CD69. Jímí předpovězený polypeptid kódoval transmembránový protein II. typu s délkou 191 aminokyselinových zbytků pozůstávající z intracelulární domény dlouhé 30, transmembránové domény dlouhé 29 a extracelulární lektinům podobné domény dlouhé 132 aminokyselinových zbytků a obsahoval dvě předpokládané místa N-glykosylace [30]. Nukleotidová sekvence cDNA a z ní odvozená aminokyselinová sekvence jsou uvedeny na str. 17 na obr. 6.

Další zmínka o tomto receptoru přišla v roce 2001, kdy Eichler a jeho kolegové ve své studii potvrdili podobnost LLT1 a AICL s CD69 na základě jejich vysoké míry homologie, ale taky toho, že patří mezi molekuly široce rozšířené na periferních lymfocytech v raných stádiích aktivace a jsou těžko detekovatelné v nestimulovaných buňkách [32].

První zmínka o jeho funkci přišla v roce 2004 kdy Mathew a jeho kolegové oznámili, že vytvořili monoklonální protilátku L9.7, která se specificky váže s receptorem LLT1 a studovali funkční úlohu LLT1 v lidských NK buňkách. Navázání mAb L9.7 na povrch LLT1 indukovalo produkci IFN- γ , ale neměnilo cytotoxicitu linie lidských NK buněk YT. Ukázali taky, že v klidových („resting“) NK buňkách podobně jako i v IL-2 aktivovaných NK buňkách LLT1 indukovalo produkci IFN- γ , ale ne cytotoxicitu. Nadbytek L9.7 nezvýšil míru přirozené cytolytické aktivity ani ADCC, zatímco minimální množství vyvolalo maximální

gaattccggcaaa ATG CAT GAC AGT AAC AAT GTG GAG AAA GAC ATT ACA CCA -52
 M H D S N N V E K D I T P -13

TCT GAA TTG CCT GCA AAC CCA GGT TGT CTG CAT TCA AAA GAG CAT -97
 S E L P A N P G C L H S K E H -28

TCT ATT AAA GCT ACC TTA ATT TGG CGC TTA TTT TTC TTA ATC ATG TTT -145
 S I K A T L I W R L F F L I M F -44

CTG ACA ATC ATA GTG TGT GGA ATG GTT GCT GCT TTA AGC GCA ATA -190
 L T I I V C G M V A A L S A I -59

AGA GCT AAC TGC CAT CAA GAG CCA TCA GTA TGT CTT CAA GCT GCA -235
 R A N C H Q E P S V C L Q A A -74

TGC CCA GAA AGC TGG ATT GGT TTT CAA AGA AAG TGT TTC TAT TTT -280
 C P E S W I G F Q R K C F Y F -89

TCT GAT GAC ACC AAG AAC TGG ACA TCA AGT CAG AGG TTT TGT GAC -325
 S D D T K N W T S S Q R F C D -104

TCA CAA GAT GCT GAT CTT GCT CAG GTT GAA AGC TTC CAG GAA CTG -370
 S Q D A D L A Q V E S F Q E L -119

AAT TTC CTG TTG AGA TAT AAA GGC CCA TCT GAT CAC TGG ATT GGG -415
 N F L L R Y K G P S D H W I G -134

CTG AGC AGA GAA CAA GGC CAA CCA TGG AAA TGG ATA AAT GGT ACT -460
 L S R E Q G Q P W K W I N G T -149

GAA TGG ACA AGA CAG TTT CCT ATC CTG GGA GCA GGA GAG TGT GCC -505
 E W T R Q F P I L G A G E C A -164

TAT TTG AAT GAC AAA GGT GCC AGT AGT GCC AGG CAC TAC ACA GAG -550
 Y L N D K G A S S A R H Y T E -179

AGG AAG TGG ATT TGT TCC AAA TCA GAT ATA CAT GTC TAG atgttacagca -600
 R K W I C S K S D I H V * -191

aagccccaactaatcttagaagcatattggaactgataactccattttaaagatgcaagaattatttcttataccaacagg -685

tatatgaaaatatgctcaatatcactaataactgggaaaatacaaatcaaatcatagtaaaatattacctgtttcatggtgct -770

aatattacctgttctcccactgctaatgacataccgagaatgagtaattataataaaaagagatttaattgaaaaaaa -850

Obr. 6. Nukleotidová sekvence cDNA LLT1. Malými písmeny je vyznačena nekódující oblast, velkými kódující a z ní odvozená aminokyselinová sekvence. Jednou čarou je označen předpokládaný transmembránový segment, dvojitou čarou jsou vyznačena potenciální místa glykosylace, stop kodon je označen hvězdičkou [30].

produkci IFN- γ YT a aktivovanými NK buňkami. Tato pozorování podpořila názor o separaci signálních drah regulujících cytotoxicitu a produkci IFN- γ klidovými i aktivovanými NK buňkami [33].

V roce 2005 Sally L. Rogers s jejím týmem na základě bioinformatické analýzy 2 sad exonů, o kterých se předpokládalo, že kódují domény lektinů C typu, identifikovali první nesavčí („nonmammalian“) receptory homologní se specifickým receptory kódovanými savcím NKC. Srovnání aminokyselinových sekvencí různých CRD a CTLD vedlo ke zjištění, že první sada exonů B-NK je nejpravděpodobněji homologní s lidským receptorem NKR-P1A (CD161) a druhá B-lec s lidským LLT1. Tato fakta potvrzuje i výskyt jednotlivých genů relativně blízko u sebe a taky jejich přepis v opačném směru. Jako pravděpodobnější uvádí kolektiv autorů možnost, že geny lektinů C typu byly původně částí MHC, ale vytratili se z něj v linii vedoucí k savcům [34].

Dvě nezávislé skupiny publikovaly další články, ve kterých definují LLT1 jako fyziologický ligand pro lidský receptor NKR-P1A (CD161).

První skupina ve svém článku na základě charakterizace LLT1 jako ligandu pro NKR-1A potvrdila předpoklad, že LLT1 je lidský ortholog myších molekul Clr. Také tato práce vedla ke zjištění, že inkubace CD161⁺ NK nebo T buněk s LLT1 exprimující cílovou buňkou vede ke snížení míry exprese CD161 a že interakce cílových buněk exprimujících LLT1 s CD161⁺ NK buňkami snižuje míru cytotoxicity zprostředkované NK buňkami a míru produkce IFN- γ . Interakce LLT1-CD161 nevyvolala produkci IFN- γ T buňkami, ale simultánní působení signálů z receptorů CD3 a CD161 zvýšilo sekreci IFN- γ v porovnání s působením samotného receptoru CD3. Tyto výsledky odhalují zajímavou vlastnost receptoru CD161: schopnost spouštět protichůdné signály v NK a T buňkách, i když jsou transkripty a proteiny stejné v obou typech buněk [25].

Ve druhé publikaci Rosen a jeho kolegové dospěli k závěru, že LLT1 je ligandem pro lidský receptor NKR-P1A a tato interakce inhibuje cytotoxicitu NK buněk. Potvrdili i hypotézu Rogersové a jejích spolupracovníků, že B-NK a B-lec kódované kuřecí MHC oblastí a NKR-P1A a LLT1 jsou orthology. Vystala tedy otázka, jestli B-NK a B-lec společně interagují a zda-li mohou být interakce podobné interakci NKR-P1 s LLT1 chráněny v průběhu evoluce. Interakce NKR-P1A-LLT1 v lidském organismu tímto poskytla náhled na další mechanismus doladování odpovědí NK a T buněk za použití inhibičního receptoru rozeznávajícího ne-MHC ligand („non-MHC ligand“) [28].

2. CÍL PRÁCE

- 1.) izolovat RNA ze směsi NK buněk a CD3⁺ lymfocytů
- 2.) připravit fragment DNA kódující extracelulární doménu receptoru LLT1 metodou RT-PCR
- 3.) ověřit nukleotidovou sekvenci připraveného fragmentu DNA sekvenací

3. MATERIÁL

3.1 Přístroje

Automatické pipety	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga MPW-375	<i>Mechanika Precyzyjna, Polsko</i>
Centrifuga VSMC-13	<i>Shelton Scientific, USA</i>
Chladnička	<i>Skandiluxe, Dánsko</i>
Dokumentační systém LAS-reader	<i>FUJI, Japonsko</i>
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	<i>Genomed, Německo</i>
JETQUICK Plasmid Purification Spin Kit	<i>Genomed, Německo</i>
Mrazicí box (-80° C) Ultra Low	<i>Revco, USA</i>
Mrazicí box (-20° C)	<i>Zanussi, Itálie</i>
pH metr Φ200	<i>Beckman, USA</i>
Předvážky HF 1200G	<i>AND, USA</i>
Souprava pro elektroforézu	<i>Sigma, USA</i>
Spektrofotometr SPEKTROMOM 195D	<i>MOM, Maďarsko</i>
Termocykler	<i>Eppendorf, Německo</i>
Termostat BT 120M	<i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i>
Třepačka	<i>Thermolyne, USA</i>
UV Lampa UVGL-58	<i>UVP, USA</i>
Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
Zdroj deionizované vody MilliQ	<i>Millipore, USA</i>
Zdroj napětí	<i>Vývojové dílny ČSAV, ČR</i>

3.2 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly minimálně čistoty p.a.

Agar	<i>Oxoid, USA</i>
Agarosa	<i>Fluka, Německo</i>
Ampicilin	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
ATP	<i>Stratagene, USA</i>
Bacto-trypton	<i>Oxoid, USA</i>
Bacto-yeast extract	<i>Oxoid, USA</i>

Bromfenolová modř	<i>Sigma, USA</i>
BSA	<i>Sigma, USA</i>
DNA Ladder 100 bp	<i>New England Biolabs, USA</i>
dNTP	<i>MBI Fermentas, Litva</i>
Ethanol	<i>Lachema, ČR</i>
Ethidium bromid	<i>Sigma, USA</i>
Glycerol	<i>Lachema, ČR</i>
Hydroxid sodný	<i>Lachema, ČR</i>
Chlorid sodný	<i>Lachema, ČR</i>
Chlorid vápenatý	<i>Lachema, ČR</i>
Chloroform	<i>Lachema, ČR</i>
Isoamylalkohol	<i>Lachema, ČR</i>
Isopropanol	<i>Lachema, ČR</i>
Isopropylalkohol	<i>Lachema, ČR</i>
IPTG	<i>Sigma, USA</i>
Kyselina chlorovodíková	<i>Lachema, ČR</i>
Octan sodný	<i>Sigma, USA</i>
PEG 8000	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
RNA Blue	<i>Top-Bio, ČR</i>
Síran hořečnatý	<i>New England Biolabs, USA</i>
Tetracyklin	<i>Léčiva, ČR</i>
X-Gal	<i>Serva, USA</i>

3.3 Enzymy

Deep Vent DNA polymerasa (2 U/μl)	<i>New England Biolabs, USA</i>
Kpn I	<i>New England Biolabs, USA</i>
Lysozym	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
RNase A (10mg/ml)	<i>Sigma, USA</i>
RNaseOUT (40 U/ μl)	<i>Invitrogen, USA</i>
Sac I	<i>New England Biolabs, USA</i>
Sma I	<i>New England Biolabs, USA</i>
Superscript II (50 U/μl)	<i>Invitrogen, USA</i>
T4 DNA ligasa (5 Weiss U/ μl)	<i>MBI Fermentas, Litva</i>

3.4 Vektory

pBluescript SK+

Stratagene, USA

3.5 Primery

LLT1FWM2: 5'-TGCAAGCTGCATGCCAGAAAG-3' *Generi Biotech, ČR*

LLT1RXHO: 5'-CCTCGAGCTAGACATGTATATCTGATTTGGA-3'

Generi Biotech, ČR

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer

Invitrogen, USA

3.6 Bakteriální kmeny

XL-1 Blue MRF^r: $\Delta(mrcA)$ 183 $\Delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)$ 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*[F⁺ *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10(Tet^r)] – *Stratagene, USA*

3.7 Směs buněk použitá na izolaci RNA

80 % lidských CD3⁺ lymfocytů a 20 % lidských NK buněk aktivovaných IL-2

3.8 Média

LB: 1% bacto-trypton; 0,5% bacto-yeast extract; 1% NaCl; pH=7,3-7,4

LB agar: 1,5% agar v LB médiu

použité koncentrace antibiotik: ampicilin 150 μ g/ml

tetracyklin 12,5 μ g/ml

3.9 Roztoky a pufry

5x First Strand Buffer

Invitrogen, USA

10x Buffer for T4 DNA ligase

MBI Fermentas, Litva

10x NEBuffer 1

New England Biolabs, USA

10x NEBuffer 2

New England Biolabs, USA

10x NEBuffer 3

New England Biolabs, USA

10x NEBuffer 4

New England Biolabs, USA

10x ThermoPol Reaction Buffer

New England Biolabs, USA

Lyzační roztok pro minipreparativní izolaci plasmidové DNA:

10 mM Tris-HCl (pH=8,0); 1 mM EDTA; 15% sacharosa; 2 μ g/ml lysozym; 0,2 μ g/ml RNasy A; 0,2 μ g/ml BSA; uchovávaný při -20° C

Roztok I: 50 mM glukosa; 25 mM Tris-HCl (pH = 8); 10 mM EDTA (pH = 8)

Roztok II: 0,2 M NaOH; 1% SDS

Roztok III: 3 mM KAc; 10% kyselina octová

TE pufr: 10 mM Tris; 1mM EDTA; doladění na pH=7,5 HCl

TAE pufr: 40 mM Tris; 20 mM kyselina octová; 1 mM EDTA; pH=8,0

Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu (STOP roztok):

50 mM EDTA; 50% glycerol; 0,05% bromfenolová modř; pH=8,0

4. METODY [36]

4.1 Izolace RNA

Suspenze $5 \cdot 10^6$ - 10^7 buněk, z kterých se izolovala RNA, byla odstředěna při 6000 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Po odstranění supernatantu byl k peletě přidán 1 ml roztoku RNA Blue a peleta rozsuspendována opakovaným pipetováním. Po 5 minutové inkubaci při laboratorní teplotě bylo k suspenzi přidáno 200 μ l chloroformu, dále následovalo intenzivní promíchávání vortexem po dobu 20 sekund a 5 minutová inkubace při laboratorní teplotě. Potom byl vzorek 15 minut odstředován při 12 000 g při 4 °C. Po odstředování se směs rozdělila na horní bezbarvou vodní fázi, interfázi a modrou organickou fázi. Pipetou byla ze směsi odebrána vodní fáze, v které se nacházela RNA a převedla se do nové mikrokumavky. K vodní fázi bylo přidáno 500 μ l isopropylalkoholu. Po 10 minutové inkubaci při 4 °C byla směs odstředována při 12 000 g při 4 °C po dobu 15 minut. Po odstranění supernatantu byl k sedimentu přidán 1 ml 75% etanolu, směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu a následně odstředěna při 12 000 g při 4 °C po dobu 5 minut. Po odstranění supernatantu byla peleta sušena 60 minut na vzduchu a následně rozpuštěna v potřebném množství sterilní deionizované vody bez RNas. Při izolaci RNA se pracovalo v jednorázových rukavicích, používaly se špičky a mikrokumavky bez RNas. Podle výrobce RNA Blue použitím tohoto postupu lze izolovat 5-10 μ g RNA.

4.2 Reverzně transkriptasová PCR (RT-PCR)

Použitá metoda RT-PCR se skládala z dvou kroků, jednak ze syntézy cDNA tj. reverzní transkripce RNA na cDNA a z následné amplifikace cDNA fragmentu polymerasovou řetězovou reakcí.

4.2.1 Syntéza cDNA

Reakce probíhala v celkovém objemu 20 μ l. K 1 ng – 5 μ g izolované RNA byl přidán 1 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈ o koncentraci 500 μ g/ml, a směs byla doplněna do 12 μ l sterilní, deionizovanou vodou bez nukleas. Směs byla inkubována 5 minut při 65 °C a potom ponechána stát 5 minut na ledu. K reakční směsi byl dále přidán 1 μ l 10 mM dNTPs, 4 μ l 5 x koncentrovaného pufru First-Strand Buffer, 2 μ l 0,1 M DTT a 1 μ l RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l). Směs byla promíchána opakovaným pipetováním a inkubována 2 minuty při 25 °C. Potom byl přidán 1 μ l reverzní transkriptasy Superscript II (50 U/ μ l), směs byla opět

promíchána, inkubována 10 minut při 25 °C a následně 50 minut při 42 °C. Reakce byla ukončena 15 minutovou inkubací při 70 °C a následným ochlazením na ledu.

4.2.2 PCR amplifikace cDNA fragmentu

Polymerasová řetězová reakce se používala na amplifikaci požadovaného úseku DNA in vitro. Reakce probíhala v celkovém objemu 50 µl. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 30 µl sterilní deionizované vody; 1,5 µl 100 mM síranu horečnatého; 5 µl 10 x koncentrovaného pufru ThermoPol Reaction Buffer; dále 5 µl 5 µM forward primeru a 5 µl 5 µM reverse primeru; 1,5 µl 10 mM dNTPs, 1 µl vzorové DNA („template DNA“; v tomto případě cDNA připravené výše uvedeným postupem) a 0,5 µl Deep Vent DNA polymerasy (2 U/µl). Mikrozkušavka s reakční směsí byla umístěna do termocykléru s nastaveným programem podle termálního profilu, který je uvedený v Tabulce 2.

Tabulka 2.: Termální profil

Krok	Název procesu	Teplota	Čas	Počet cyklů
1.	Denaturace	94 °C	2 minuty	1
2.	Denaturace	94 °C	30 sekund	35
	Hybridizace primerů	53-58 °C	30 sekund	
	Syntéza DNA	72 °C	1 minuta	
3.	Syntéza DNA	72 °C	10 minut	1
4.	Ukončení	4 °C	Podle potřeby	1

4.3 Elektroforéza v agarosovém gelu

Elektroforéza v agarosovém gelu se používala k identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA. Na dělení jednotlivých fragmentů DNA se používal 2% agarosový gel s obsahem ethidium bromidu. Při přípravě 2% agarosového gelu byla směs obsahující 40 ml pufru TAE a 0,5 g agarosy zahřáta na elektrickém vařiči do varu. Po rozvaření agarosy byl roztok nechán zchladnout na asi 60 °C, byly přidány 2 µl ethidium bromidu o koncentraci 10 mg/ml, roztok byl nalit do elektroforetické vaničky o velikosti 10,0 x 7,5 x 1,0 cm, do které se vložil 16-jamkový hřeben a gel byl nechán ztuhnout při laboratorní teplotě. Po ztuhnutí byl hřeben z gelu vytažen, vanička vložena do elektroforetické soupravy s obsahem TAE pufru a do jednotlivých jamek bylo napipetováno 13 µl směsi analyzovaného vzorku a STOP roztoku (10 µl analyzovaného vzorku + 3 µl STOP roztoku). Samotná elektroforéza probíhala při konstantním napětí 80 V (intenzita elektrického pole 5 V/cm) po dobu 40-60 minut. K vizualizaci separované DNA se využívala fluorescence komplexu DNA

a interkalovaného ethidium bromidu po osvětlení UV zářením. Digitální záznam byl pořízen dokumentačním systémem LAS-reader. Na přibližné určení molekulové hmotnosti byla používána komparace s komerčně dostupným markerem DNA Ladder 100 bp nebo s markerem, který byl připraven rozštěpením vektoru pRSET B restriktasou Dde I.

4.4 Izolace a purifikace fragmentů DNA z agarosového gelu

Na izolaci a purifikaci fragmentů DNA z agarosového gelu se používala komerční souprava *JETQUICK Gel Extraction Spin Kit* od firmy Genomed. Po elektroforetickém rozdělení fragmentů byl na transiluminačním stole čistým skalpelem vyřezán pruh agarosy obsahující požadovaný fragment DNA. Pruh agarosového gelu s DNA byl umístěn do mikrozkušavky a odvážen na předvážkách. Do mikrozkušavky byl napipetován příslušný objem roztoku L1 (na 100 mg vyřezaného gelu 300 µl roztoku L1) a směs byla inkubována při 50 °C po dobu 15 minut. Po roztavení gelu byl roztok napipetován do minikolony *Jetquick*, která byla umístěná v 2 ml mikrozkušavce a odstředována při 12 000 g 1 minutu při laboratorní teplotě. Minikolona byla dále promyta 500 µl roztoku L2 a opět odstředěna při 12 000 g 1 minutu. Po odstranění filtrátu z 2 ml mikrozkušavky bylo odstředování zopakováno. Nakonec byla minikolona vložena do nové mikrozkušavky, na membránu minikolony bylo napipetováno 50 µl TE pufru a poté odstředováno při 12 000 g po dobu 2 minut. Takto vyizolovaná a vypurifikovaná DNA byla použita na další účely jako například ligaci nebo PCR amplifikaci.

4.5 Ligace – spojení fragmentů DNA

K tomuto účelu se používala T4 DNA ligasa, která katalyzovala tvorbu fosfodiesterových vazeb mezi sousedními 3'-hydroxylovými a 5'-fosfátovými konci. T4 DNA ligasa se používala jak na spojování fragmentů s tzv. lepivými („sticky“) přečnívajícími komplementárními konci, tak i na spojování fragmentů s tupými konci.

4.5.1 Ligace fragmentů DNA s tupými konci

Při vkládání insertu do klonovacího vektoru pBluescript SK+ byla použita tato metoda. K 23,5 µl vyizolované a vypurifikované DNA (podle výše uvedeného postupu) bylo přidáno 1,0 µl klonovacího vektoru pBluescript SK+ o koncentraci 1 µg/ml; dále 3,0 µl 10 x koncentrovaného pufru NEB 4; 1,5 µl restriktasy Sma I; 0,75 µl 20 mM ATP a 0,5 µl T4 DNA ligasy (5 Weiss U/µl). Reakční směs byla ponechána stát 4 hodiny anebo celou noc při

laboratorní teplotě. Produkt ligace byl následně použitý při transformaci kompetentních buněk určených na amplifikaci plasmidu.

4.5.2 Ligace fragmentů DNA s komplementárními konci

Při tomto postupu ligační směs byla připravena z 5 μ l sterilní deionizované vody, z 9 μ l vyizolované a vypurifikované DNA, z 3 μ l vyizolovaného a vypurifikovaného linearizovaného vektoru, dále byly přidány 2 μ l 10 x koncentrovaného ligačního pufru pro T4 DNA ligasu a 1 μ l T4 DNA ligasy. Reakce probíhala 4 hodiny nebo celou noc při 16 °C. Produkt ligace se následně použil při transformaci kompetentních buněk.

4.6 Příprava kompetentních buněk

Kompetentní buňky se připravovaly metodou využívající chlorid vápenatý. Nejprve byl inokulován LB agar v Petriho miskách příslušným bakteriálním kmenem a následně byl inkubován 12-30 hodin při teplotě 37 °C. Vyrostlémi koloniemi byly zaočkovány dvě 50 ml LB média a byly inkubovány při 37 °C za intenzivního třepání (220 otáček za minutu) do $OD_{600}=0,3-0,4$. Poté byla suspenze buněk umístěna do 50 ml polypropylenových zkumavek (Falcon) a ponechána stát na ledě 10 minut. Následně byla směs odstředována při 1500 g při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Po oddělení supernatantu se zkumavky nechaly stát 1 minutu v obrácené poloze, aby se odstranily zbytky média. Potom bylo k peletám přidáno vychlazenou špičkou 10 ml 100 mM chloridu vápenatého vychlazeného na teplotu 0 °C. Po 10 minutové inkubaci na ledě byla směs odstředována 10 minut při 1500 g a teplotě 4 °C. Po oddělení supernatantu se zkumavky opět nechaly 1 minutu v obrácené poloze, aby se odstranily zbytky chloridu vápenatého. K peletám byly následně přidány 2 ml 100 mM chloridu vápenatého vychlazeného na 0 °C, peleta byla rozsuspendována opakovaným pipetováním a takto připravená směs byla inkubována 24 hodin na ledě. Do zkumavek byly pak přidány 2 ml sterilního 50% glycerolu a následně byly přeneseny 400 μ l alikvoty do mikrozkušavek, které byly uchovány při teplotě -80 °C.

4.7 Transformace kompetentních buněk

Při transformaci byly kompetentní buňky uchovávané při teplotě -80 °C ponechány pomalu rozmrazit na ledu. Ke 200 μ l kompetentních buněk bylo přidáno 10 ng – 1 μ g plasmidové DNA. Po 30 minutové inkubaci na ledu byly buňky vystaveny tepelnému šoku při teplotě 42 °C po dobu 50 sekund. Po tepelném šoku byly buňky ihned umístěny na led, po

jedné minutě byl k nim přidán 1 ml LB média a vzniklá suspenze inkubována při teplotě 37 °C 1 hodinu. Potom byly buňky odstředovány při 2500 g 2 minuty při laboratorní teplotě. Peleta byla rozsuspendována v 100-200 µl LB média a vzniklá suspenze byla pomocí vyžíhané, vychlazené skleněné tyčinky rozetřena po povrchu LB agaru s příslušnými antibiotiky v Petriho misce. Na negativní kontrolu transformace byly použity netransformované buňky, které byly taktéž rozetřeny po povrchu LB agaru s příslušnými antibiotiky. Petriho misky s inokulovaným LB agarem byly inkubovány při 37 °C po dobu 12-30 hodin resp. do vytvoření viditelných kolonií.

V případě transformace kompetentních buněk rekombinantním plasmidem obsahujícím vektor pBluescript SK+ bylo 30 minut před inokulací LB agaru rozetřeno na LB agaru 20 µl X-Gal o koncentraci 50 mg/ml a 100 µl 100 mM IPTG. Přítomnost vloženého insertu v příslušném vektoru dokazovala α -komplementace (blue-white selekce) t.j. kolonie bakterií obsahující rekombinantní plasmid byly bílé barvy, zatímco kolonie obsahující plasmid bez insertu byly zbarvené na modro.

4.8 Selektce klonů a očkování tekutých médií

Několik bílých kolonií bylo přeočkováno do zkumavek, které obsahovaly 5 ml sterilně napipetovaného LB média. Zkumavky byly jemně uzavřeny tak, aby do nich mohl pronikat vzduch a byly inkubovány v třepačce při 37 °C za intenzivního třepání (250 otáček za minutu) do $OD_{600}=0,3-0,4$.

4.9 Minipreparativní izolace plasmidové DNA

Plasmidová DNA byla izolována z buněčné kultury příslušného bakteriálního kmene, která byla kultivována do pozdní logaritmické fáze v tekutém LB médiu obsahujícím antibiotika, které zajišťovaly selekci příslušných transformantů. Na minipreparativní izolaci plasmidové DNA se používali dva postupy v závislosti na požadovaném množství a čistotě izolované DNA.

4.9.1 Minipreparace plasmidové DNA lyzačním puřrem

Tato metoda slouřila k rychlé izolaci plasmidové DNA, která byla potom použita především na restrikční analýzu. Nevýhodou byla nízká čistota izolované DNA, například takto izolovanou DNA neřtěpil restrikční enzym Nde I.

Po kultivaci byl 1 ml buněčné kultury odstředován při 6000 g 1 minutu při laboratorní teplotě. Po odstranění supernatantu bylo k peletě přidáno 20 µl lyzačního pufru a suspenze se míchala 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byla suspenze vystavena 90 sekundovému varu a poté ponechána zchladit 10 minut na ledě. Následovalo odstředění při 12 000 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Získaný supernatant obsahoval plasmidovou DNA, která se používala na restriční analýzu.

4.9.2 Minipreparace plasmidové DNA na komerčním nosiči

Tento postup se používal k izolaci plasmidové DNA s vysokou čistotou, která byla potom používána při transformacích kompetentních buněk, při některých restričních analýzách a různých enzymatických reakcích. K minipreparaci byl použit komerční kit *JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit* od firmy Genomed.

Po kultivaci bylo 5 ml buněčné kultury odstředěno při 12 000 g po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě. Po odsátí supernatantu byla peleta opakovaným pipetováním rozsuspendována v 250 µl roztoku G1. Následně bylo přidáno 250 µl roztoku G2, vzniklá suspenze byla opatrným převrácením mikrozkušavky promíchána a ponechána inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Potom bylo přidáno 350 µl roztoku G3, směs byla opatrně promíchána obrácením mikrozkušavky a odstředována při 12 000 g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Supernatant byl napipetován do minikolony *Jetquick*, která byla vložena do 2 ml mikrozkušavky. Následovalo odstředování při 12 000 g po dobu 1 minuty. Minikolona byla dále promyta 500 µl roztoku G4 a znovu odstředována při 12 000 g po dobu 1 minuty. Po odstranění filtrátu z 2 ml mikrozkušavky se zopakovalo odstředování při 12 000 g po dobu 1 minuty. Nakonec byla minikolona vložena do nové mikrozkušavky, na membránu minikolony bylo napipetováno 50 µl 10 mM Tris-HCl pufru (pH = 8) a kolona se odstředovala při 12 000 g 2 minuty. Takto připravená plasmidová DNA byla použita na další experimenty, případně uskladněna při teplotě -20 °C.

4.10 Štěpení DNA restričními endonukleasami

Při práci s restričními enzymy se postupovalo podle pokynů výrobce. Štěpení DNA restričními endonukleasami se využívalo především při restričních analýzách, kdy bylo do mikrozkušavky napipetováno 9 µl izolované plasmidové DNA, 1 µl příslušného 10 x koncentrovaného pufru, 0,3 až 0,5 µl restriční endonukleasy, případně 0,1 µl BSA. Směs byla ponechána stát při optimální teplotě po dobu 1-3 hodiny. Reakce byla ukončena přidáním STOP roztoku nebo tepelnou inaktivací enzymu (podle doporučení výrobce).

4.11 Maxipreparace plasmidové DNA

Tato metoda byla použita k finální preparaci plasmidové DNA. Po kultivaci bylo 200 ml bakteriální kultury přesunuto do 250 ml lahví a centrifugováno při 2500 g při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Peleta byla rozsuspendována ve 20 ml glukosového roztoku I. Poté byl roztok přenesen do menších 35 ml nádob a centrifugován při 5000 g při teplotě 4 °C 10 minut. Po zbavení se supernatantu bylo k peletě přidáno 3,5 ml glukosového roztoku I a 5 mg lysozymu na ml přidaného glukosového roztoku I. Směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu a inkubována při laboratorní teplotě 5 minut. Následně bylo přidáno 7 ml čerstvě připraveného roztoku II a směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu a inkubována na ledu 10 minut. Po přidání 5,2 ml roztoku III byla směs jednou důkladně promíchána, ponechána precipitovat 10 minut na ledu a odstředována při 12000 g při teplotě 20 °C 30 minut. Po přenesení supernatantu do nové zkumavky následovalo srážení 10 ml isopropanolu při pokojové teplotě 15 minut a poté centrifugování při 12000 g při teplotě 20 °C po dobu 30 minut. Peleta byla rozpuštěna v 2 ml TE pufru, bylo přidáno 10 µl RNasy A o koncentraci 10 mg na ml a směs byla ponechána při teplotě 37 °C 30 minut. Pak byla provedena extrakce 2 ml směsi fenolu a chloroformu v poměru 1:1, následovalo odstředování při 12000 g při teplotě 4 °C 10 minut. Horní kapalná fáze byla přenesena do nové zkumavky. Extrakce dále pokračovala přidáním 2 ml směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1, opětovným odstředováním při 12000 g při teplotě 4 °C 10 minut. Horní kapalní fáze byla přenesena do nové zkumavky a srážena 200 µl 3 M octanu sodného (pH = 5,2) a 5 ml 95% ethanolu. Prvních 10 minut srážení probíhalo při -70 °C, pak dalších 20 minut při -20 °C. Zatím následovala centrifugace při 12000 g při 4 °C 20 minut, vysušení peletu při pokojové teplotě, rozpuštění ve 160 µl destilované vody a přenesení do nové mikrozukavky Eppendorf. Další precipitace byla provedena přidáním 40 µl 4 M NaCl, 200 µl 13% PEG 8000 a inkubováním při teplotě -20 °C přes noc. Po rozmražení a centrifugaci při 12000 g při teplotě 4 °C po dobu 10 minut následovalo rozpuštění peletu ve 100 µl destilované vody. Pak se pokračovalo extrakcí 100 µl fenolu, stočením směsi při 12000 g při teplotě 4 °C po dobu 10 minut a přenesením horní kapalní fáze do nové mikrozukavky. Poté byla zopakována extrakce přidáním 100 µl směsi fenolu a chloroformu (1:1), následována stočením směsi při 12000 g při teplotě 4 °C po dobu 10 minut a přenesením horní kapalní fáze do nové mikrozukavky. Po další extrakci přidáním 100 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1) byl roztok centrifugován při 12000 g při teplotě 4 °C po dobu 10 minut a horní kapalná fáze přenesena do nové mikrozukavky a srážena 10 µl 3 M octanu sodného (pH = 5,2) a 250 µl 95% ethanolu. Prvních 10 minut srážení probíhalo při -70 °C, pak dalších 20 minut při -20 °C. Závěrečná

centrifugace probíhala při 12000 g při 4 °C 20 minut, následovalo vysušení peletu při pokojové teplotě ve vakuu a rozpuštění v 55 µl destilované vody. Poté byla spektrofotometricky stanovená koncentrace extrahované a vypurifikované DNA a vzorek byl vhodně naředěn.

4.12 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA a její čistota se stanovovala spektrofotometricky měřením absorbance vhodně zředěného roztoku při 260 a 280 nm. Při výpočtu koncentrace DNA se používal empirický vztah, podle kterého jednotková absorbance při 260 nm odpovídá koncentraci 50 µg dsDNA na 1 ml roztoku. Poměr absorbancí naměřených při 260 a 280 nm by měl být v případě čisté dsDNA přibližně 1,8.

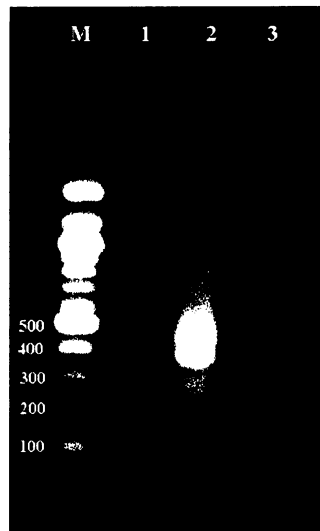
4.13 Automatické sekvenování DNA

Sekvenační reakce provedené použitím fluorescenčně značených primerů, uskutečnil Dr. Jürgen Felsberg (Sektor buněčné a molekulární mikrobiologie MBÚ AV ČR). Na sekvenaci DNA se použil automatický sekvenátor ABI Prism 3100 Genetic Analyzer.

5. VÝSLEDKY

5.1 Izolace RNA a RT-PCR

Výchozím vzorkem pro izolaci RNA byla směs tvořená z 80 % lidskými CD3⁺ lymfocyty a z 20 % lidskými NK buňkami aktivovanými IL-2, kterou poskytla MUDr. Anna Fišerová, CSc. (MBÚ AV ČR). Na izolaci RNA se použilo cca 10⁷ těchto buněk. Samotná izolace RNA byla provedena podle postupu uvedeného v metodické části. Izolovaná RNA byla použita na syntézu cDNA pomocí reverzní transkriptasy Superscript II. Reverzní transkripce byla uskutečněna podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.1. Po syntéze cDNA následovala amplifikace cDNA fragmentu kódujícího extracelulární doménu LLT1 polymerasovou řetězovou reakcí. V tomto případě byl použitý postup uvedený v kapitole 4.2.2. Na amplifikaci cDNA fragmentu kódujícího extracelulární doménu LLT1 byly použity dva oligonukleotidové primery LLT1FWM2 a LLT1RXHO, jejichž nukleotidová sekvence je uvedena v kapitole 3.5. Prostřednictvím primeru LLT1RXHO bylo do terminální sekvence kódující extracelulární část receptoru LLT1 vneseno za stop kodon restriční místo pro restriktasu Xho I. Teplota hybridizace primerů („annealing“) byla po několika neúspěšných experimentech nastavena na hodnotu 58 °C. K ověření správnosti produktu RT-PCR posloužilo srovnání délky ampliconu s markerem DNA ladder 100 bp pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. Elektroforeogram je znázorněn na str. 33 na obr. 7. Do dráhy označené (M) se aplikoval marker DNA ladder 100 bp. V dráze (1) se nachází produkt RT-PCR připravený podle postupu popsaného v kapitole 4.2 s teplotou hybridizace primerů 55 °C. V dráze (2) se nachází produkt připravený podle postupu popsaného v kapitole 4.2 s teplotou hybridizace primerů 58 °C a v dráze (3) se nachází produkt připravený podle postupu popsaného v kapitole 4.2 s teplotou hybridizace primerů 53 °C. Délka fragmentů produktu v dráze (2) přibližně odpovídala očekávané teoretické délce 366 bp a tento produkt RT-PCR se použil na další experimenty.

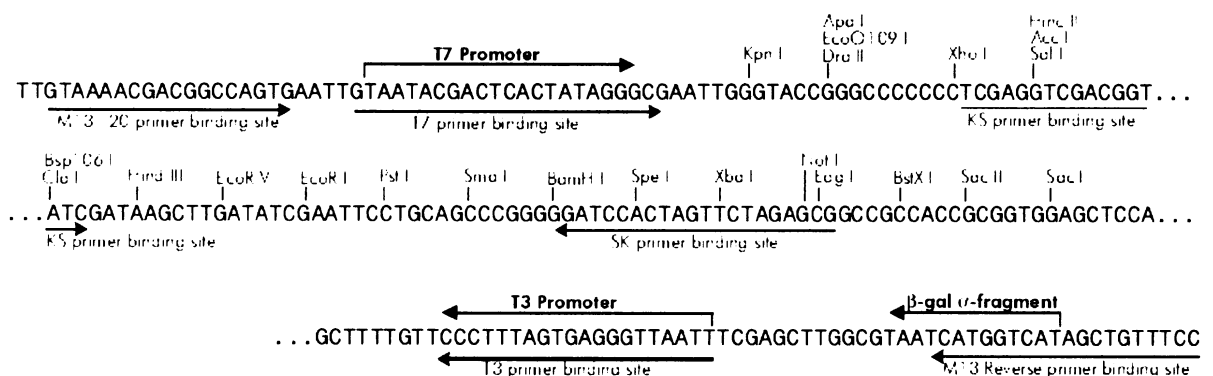


Obr. 7. Elektroforeogram produktů RT-PCR.

5.2 Příprava konstruktů pBSLLT1

pBSLLT1 je pracovní označení rekombinantního plasmidu, který se připravil vložením sekvence kódující extracelulární doménu receptoru LLT1 do vektoru pBluescript SK+.

pBluescript SK+ je klonovací vektor o celkové délce 2961 bp. Jako selekční marker tohoto vektoru slouží rezistence k ampicilinu. Vektor disponuje krátkým úsekem DNA, který obsahuje regulační sekvenci a počátek genu pro β -galaktosidasu (*lacZ*). Do tohoto úseku bylo vloženo polyklonovací místo tak, aby nedošlo k posunu čtecího rámce. Tato vlastnost se využívala při identifikaci kolonií obsahujících rekombinantní plasmid metodou α -komplementace. Kolonie bakterií obsahující rekombinantní plasmid byly bílé barvy, zatímco kolonie obsahující plasmid bez insertu byly zbarvené na modro. Polyklonovací místo vektoru pBluescript SK+ je znázorněno na obr. 8.

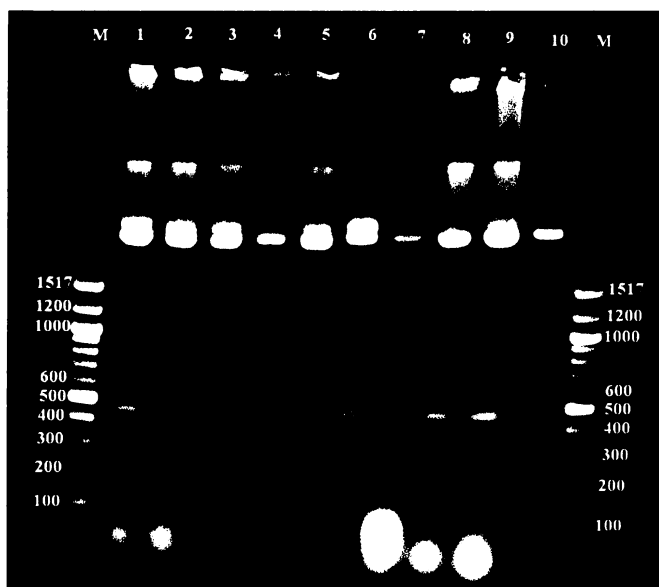


Obr. 8. Polyklonovací místo vektoru pBluescript SK+ [35].

Konstrukt pBSLLT1 byl připraven vložením produktu RT-PCR do vektoru pBluescript SK+. Použila se ligace fragmentů s tupými konci podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.1. Reakční směs obsahovala restriktasu Sma I, která štěpila vektor pBluescript SK+, dokud T4 DNA ligasa nespojila produkt RT-PCR s otevřeným vektorem. Po vložení insertu do vektoru došlo k porušení restriktčního místa pro restriktasu Sma I a takto připravený rekombinantní plasmid už dál nebyl štěpen tímto enzymem.

Dále se pokračovalo transformací kompetentních buněk produktem ligace podle postupu uvedeného v kapitole 4.7. Po 12 hodinové inkubaci vyrostlo na LB agaru v Petriho misce asi 100 kolonií, z čehož asi 40 % připadalo na modré kolonie a zbytek na bílé kolonie. Na LB agaru s negativní kontrolou nebyly přítomné žádné kolonie, čímž se vyloučila kontaminace.

Selekce klonů a inokulace tekutých médií byla provedena podle postupu uvedeného v části 4.8. Následovala minipreparativní izolace plasmidové DNA použitím komerční soupravy *JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit*. Při minipreparaci se postupovalo podle kapitoly 4.9.2. Vyizolovaná plasmidová DNA transformantů byla podrobena restriktční analýze, aby se potvrdila přítomnost vloženého insertu. Elektroforeogram restriktční analýzy je znázorněn na obr. 9.



Obr. 9. Elektroforeogram restriktční analýzy plasmidové DNA obsažené v jednotlivých koloniích.

Do dráhy (M) se aplikoval komerční marker DNA Ladder 100 bp. Dráhy (1) až (10) obsahovaly plasmidovou DNA, která se vyizolovala z bakterií nacházejících se v jednotlivých koloniích štěpenou Kpn I a Sac I. Očekávaný produkt štěpení měl obsahovat kolem 470 párů bází.

K transformaci buněk byl vybrán vzorek ekvivalentní k vzorku použitému v dráze (9) a po 16 hodinové inkubaci se na LB agaru nacházely samé bílé kolonie a žádná modrá kolonie. Na LB agaru s negativní kontrolou nevyrostly žádné kolonie. Petriho miska s koloniemi se odevzdala k automatické sekvenaci Dr. Jürgenovi Felsbergovi. Na sekvenaci byly použity primery T3 a T7. Záznam z automatického sekvenátoru je uveden v příloze. Komparace nukleotidové sekvence LLT1 z databáze GenBank s nukleotidovou sekvencí osekvenovaného insertu v LLT1 potvrdila správnost jeho sekvence.

Práce dále pokračovala maxipreparací plasmidové DNA z klonů bakteriální kolonie, která obsahovala plasmid s insertem požadované sekvence podle postupu popsáno v kapitole 4.11. U výsledného vzorku byla podle postupu v kapitole 4.12 změřena spektrofotometricky absorbance při 260 a 280 nm. Následně byla pomocí empirického vztahu určena koncentrace vzorku 3,26 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Poměr A_{260}/A_{280} byl 1,734. Poté byl vzorek naředěn na koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a uchován při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další experimenty.

6. DISKUSE

Hlavním cílem práce bylo připravit konstrukt, který by kódoval receptor LLT1. V prvním kroku se uskutečnila izolace RNA ze směsi NK buněk a CD3^+ lymfocytů, následovala reverzní transkripce resp. syntéza cDNA a PCR amplifikace cDNA fragmentu kódujícího LLT1. Dále se zkonstruoval rekombinantní plasmid pBSLLT1, který se připravil vložením produktu RT-PCR do vektoru pBluescript SK+. Rekombinantní plasmid pBSLLT1 se nakonec použil na sekvenaci vloženého insertu.

Nakonec třeba zkonstatovat, že i přes značné problémy s nastavením teploty hybridizace primerů příprava výchozího konstruktů pro extracelulární doménu receptoru LLT1 byla úspěšná. Pokusy o přípravu expresních konstruktů, které by kódovaly část extracelulární domény receptoru LLT1, bohužel doposud nebyly úspěšné. Z mé bakalářské práce zároveň vyplývají úkoly pro diplomovou práci a to: připravit expresní konstrukty kódující extracelulární doménu receptoru LLT1 a pokusit se o přípravu rekombinantního proteinu, který by po renaturaci a purifikaci mohl být využit ke studiu vazebných a strukturních poměrů.

Nejen že jsem touto bakalářskou prací získal přehled o problematice receptorů NK buněk a osvojil si práci s literaturou, taky jsem nabył praktické zkušenosti z oblasti genového inženýrství.

7. SOUHRN

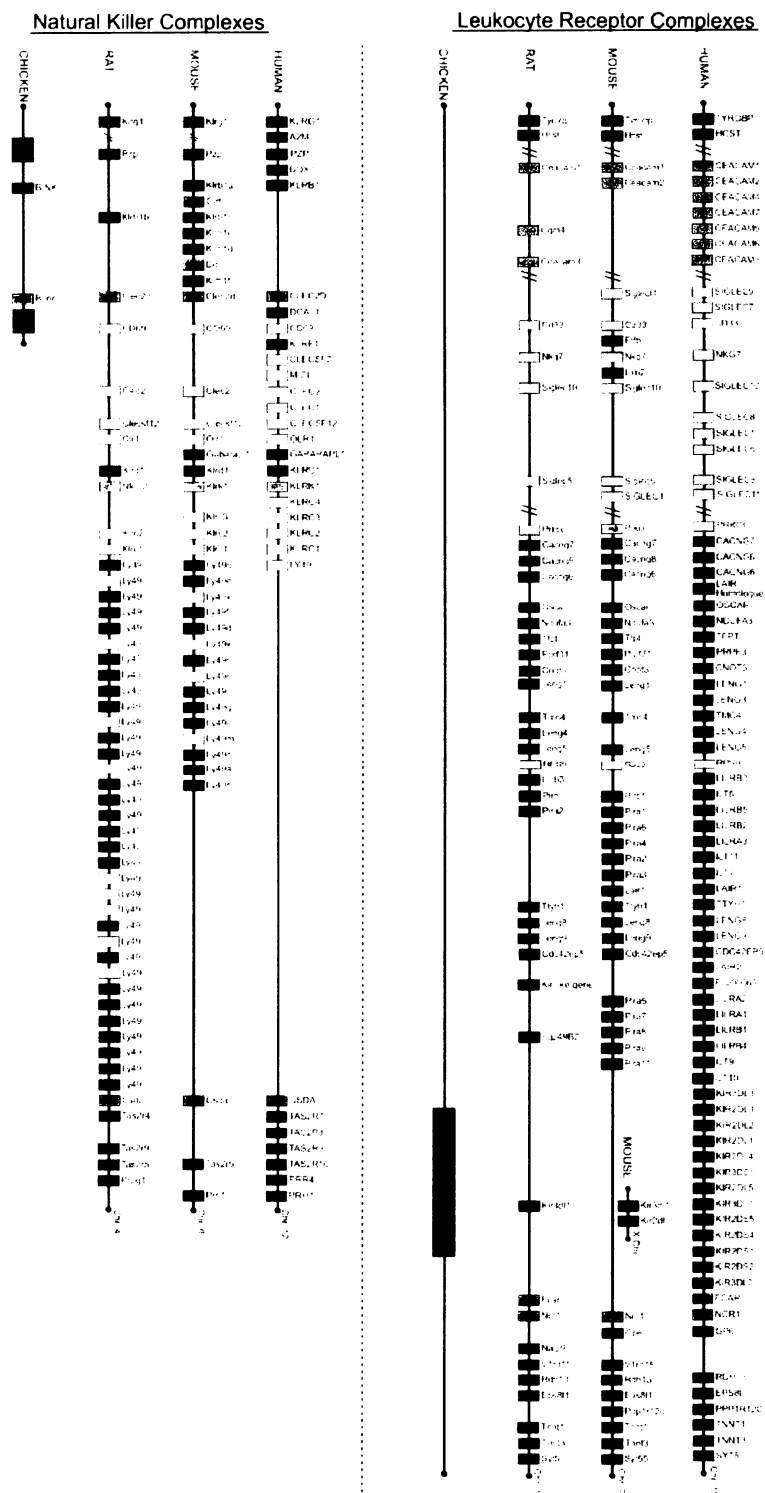
- 1.) ze směsi NK buněk a CD3⁺ lymfocytů byla izolována RNA
- 2.) pomocí RT-PCR byl připraven fragment DNA kódující extracelulární doménu receptoru LLT1
- 3.) nukleotidová sekvence připraveného fragmentu byla ověřena sekvenací
- 4.) byl připraven rekombinantní plasmid pBSLLT1 kódující extracelulární doménu receptoru LLT1

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

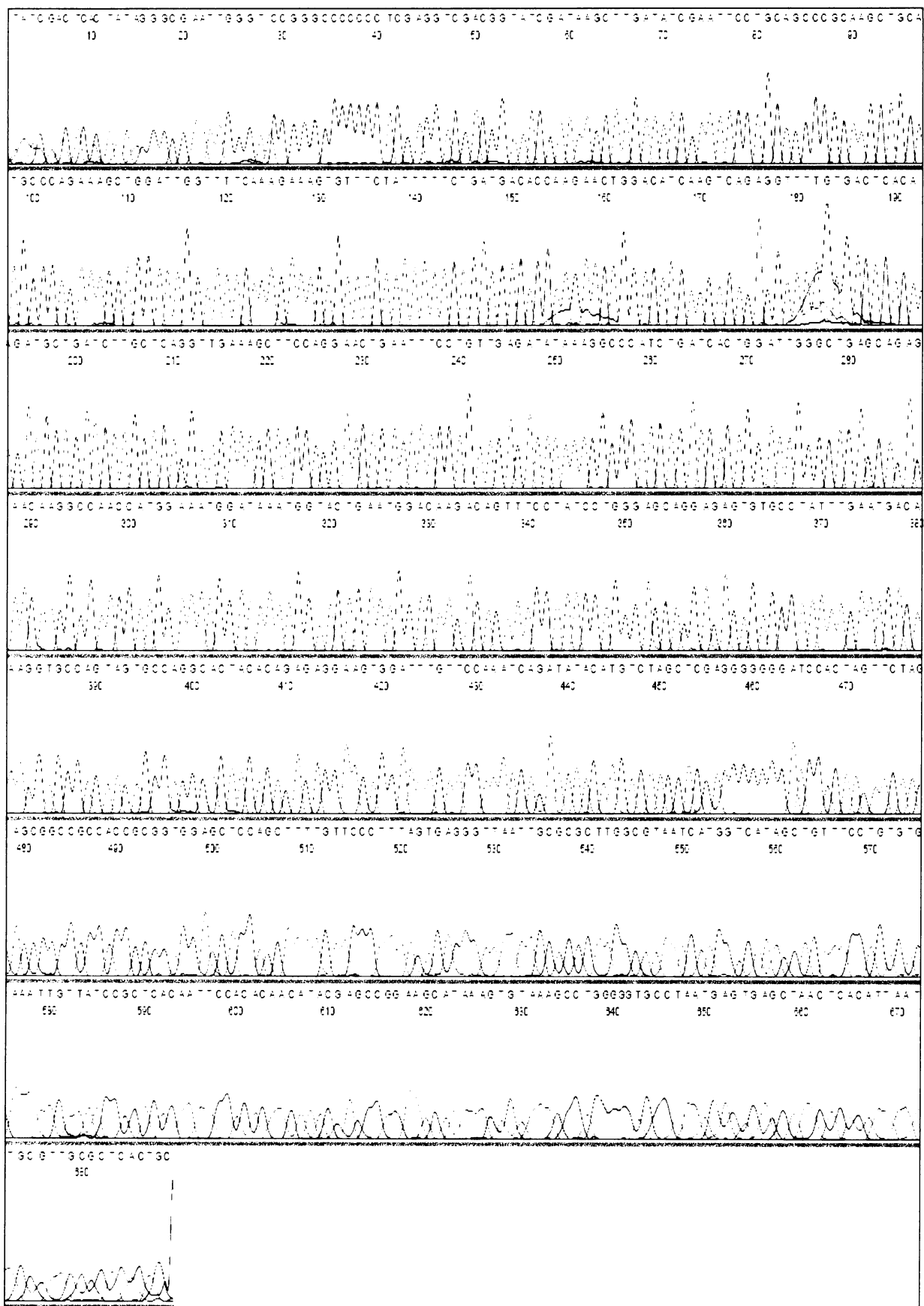
- [1] Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. Triton, Praha (2002)
- [2] Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J.: *Immunology*, 5th Edition. W.H. Freeman and Company, New York (2003)
- [3] Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: *Eur. J. Immunol.* 5, 112-117 (1975)
- [4] Yokoyama, W. M., Plougastel, B. F.: *Nat. Rev. Immunol.* 3, 304-316 (2003)
- [5] Lanier, L. L.: *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225-274 (2005)
- [6] Backstrom, E., Kristensson, K., Ljunggren, H. G.: *Scand. J. Immunol.* 60, 14-22 (2004)
- [7] Blery, M., Olcese, L., Vivier, E.: *Hum. Immunol.* 61, 51-64 (2000)
- [8] Colluci, F., Di Santo, J. P., Leibson, P. J.: *Nat. Immunol.* 3, 807-813 (2002)
- [9] Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., et al.: *Science* 285, 730-732 (1999)
- [10] Billadeau, D. D., Upshaw, J. L., Schoon, R. A., Dick, C. J., Leibson, P. J.: *Nat. Immunol.* 4, 557-564 (2003)
- [11] Stebbins, C. C., Watzl, C., Billadeau, D. D., Leibson, P. J., Burshtyn, D. N., Long, E. O.: *Mol. Cell. Biol.* 23, 6291-6299 (2003)
- [12] Wende, H., Colonna, M., Ziegler, A., Voltz, A.: *Mamm. Genome* 10, 154-160 (1999)
- [13] Martin, A. M., Kulski, J. K., Witt, C. S., Pontarotti, P., Christiansen, F. T.: *Trends Immunol.* 23, 81-88 (2002)
- [14] Kelley, J., Walter, L., Trowsdale, J.: *PLoS Genet.* 1, 129-139 (2005)
- [15] Vance, R. E., Jamieson, A. M., Raulet, D. H.: *J. Exp. Med.* 190, 1801-1812 (1999)
- [16] Braud, V. M., Allan, D. S. J., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., et al.: *Nature* 391, 795-798 (1998)
- [17] Vance, R. E., Kraft, J. R., Altman, J. D., Jensen, P. E., Raulet, D. H.: *J. Exp. Med.* 188, 1841-1848 (1998)
- [18] Valés-Gómez, M., Reyburn, H. T., Erskine, R. A., Lopez-Botet, M., Strominger, J. L.: *EMBO J.* 18, 4250-4260 (1999)
- [19] Llano, M., Lee, N., Navarro, F., Garcia, P., Albar, J. P., Geraqhty, D. E., Lopez-Botet, M.: *Eur. J. Immunol.* 28, 2854-2863 (1998)
- [20] Kraft, J. R., Vance, R. E., Pohl, J., Martin, A. M., Raulet, D. H., Jensen, P. E.: *J. Exp. Med.* 192, 613-624 (2000)
- [21] Plougastel, B., Trowsdale, J.: *Eur. J. Immunol.* 27, 2835-2839 (1997)
- [22] Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N., Raulet, D. H.: *Nat. Immunol.* 1, 119-126 (2000)

- [23] Cerwenka, A., Bakker, A. B., McClanahan, T., et al.: *Immunity* 12, 721-727 (2000)
- [24] Raulet, D. H.: *Nat. Rev. Immunol.* 3, 781-790 (2003)
- [25] Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M. J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., Braud, V. M.: *J. Immunol* 175, 7791-7795 (2005)
- [26] Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F., Fremont, D. H., Yokoyama, W. M.: *Nat. Immunol.* 4, 801-807 (2003)
- [27] Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, C. S., Arase, H., Raulet, D. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 3527-3532 (2004)
- [28] Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsarifi, M., Mathew, P. A., Warren, H. S., Lanier, L. L.: *J. Immunol.* 175, 7796-7799 (2005)
- [29] Hamann, J., Montgomery, K. T., Lau, S., Kucherlapati, R., van Lier, R. A.: *Immunogenetics* 45, 295-300 (1997)
- [30] Boles, K. S., Barten, R., Kumaresan, P. R., Trowsdale, J., Mathew, P. A.: *Immunogenetics* 50, 1-7 (1999)
- [31] Plougastel, B., Dubbelde, C., Yokoyama, W. M.: *Immunogenetics* 53, 209-214 (2001)
- [32] Eichler, W., Ruschpler, P., Wobus, M., Drossler, K.: *J. Cell. Biochem. Suppl.* 36, 201-208 (2001)
- [33] Mathew, P. A., Chuang, S. S., Vaidya, S. V., Kumaresan, P. R., Boles, K. S., Pham, H. T.: *Mol. Immunol.* 40, 1157-1163 (2004)
- [34] Rogers, S. L., Gobel, T. W., Viertlboeck, B. C., Milne, S., Beck, S., Kaufman, J.: *J. Immunol.* 174, 3475-3483 (2005)
- [35] Stratagene: *Vectors Maps & Sequences* [online]. cit. 20. 7. 2007
Dostupné z: <http://www.stratagene.com/vectors/maps/pdf/pBluescript_SK_plus.pdf>
- [36] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)

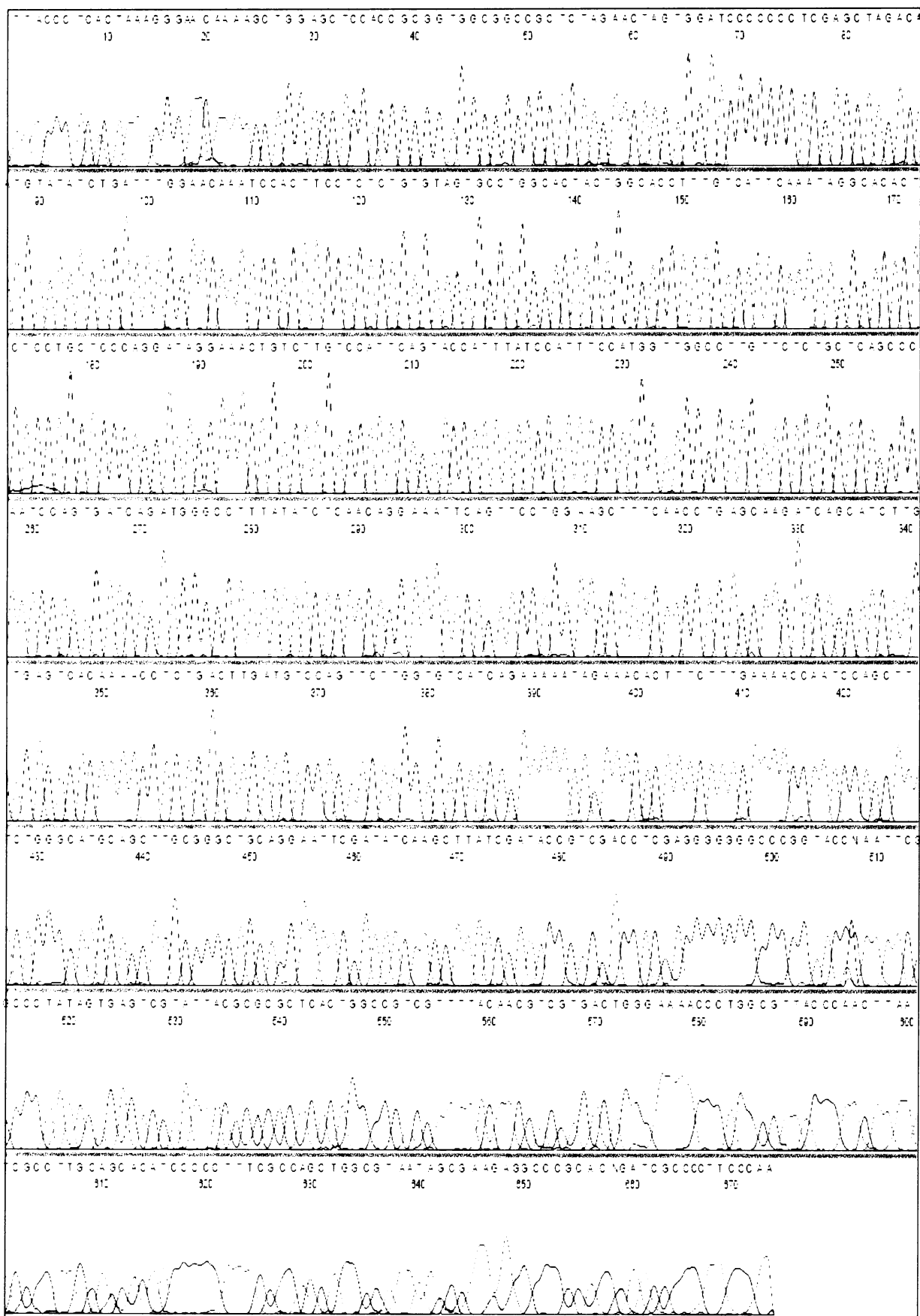
9. PŘÍLOHY



Příloha 1: Lineární srovnání genů LRC a NKC. Srovnání není uvedeno podle přesného měřítka. Barvy ukazují geny příbuzné genovou organizací, strukturou a fylogenesí. Šedá znázorňuje geny, které nejsou považovány za kódující NK receptory. Bílé obdélníky znázorňují pseudogeny. Otazníkem jsou označeny geny, které byly zmapovány pro odpovídající chromosom, no jejich specifická pozice není známá. „X“ značí, že gen není homologní s geny sdílejícími jeho vertikální pozici. Převzato z [14].



Příloha 2: Záznam z automatického sekvenátoru sekvenace pBSLLT1 forward primerem T7.



Příloha 3: Záznam z automatického sekvenátoru sekvenace pBSLLT1 reverse primerem T3.

