

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Matouš Tulpa

**GALEKTIN-3 A JEHO INTERAKCE S RECEPTOREM PŘIROZENÉ  
CYTOTOXICITY NKp30**

Galectin-3 and its interaction with the natural cytotoxicity receptor NKp30

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Ondřej Skořepa

Praha, 2021

## PROHLÁŠENÍ

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 21. června 2021

---

Matouš Tulpa

## PODĚKOVÁNÍ

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D., za odborné vedení mé bakalářské práce, trpělivost, ochotu poradit a učit mě novým věcem. Děkuji také Mgr. Ondřeji Skořepovi za četné konzultace, cenné rady a poskytnutí materiálů pro experimentální část práce. Dále bych chtěl poděkovat všem členům laboratoře 204, jmenovitě Mgr. Barboře Kalouskové a Maxmiliánu Hejlovi za příjemné a přátelské pracovní prostředí.

## ABSTRAKT

NK buňky jsou důležitou součástí vrozeného imunitního systému. Jde o velké granulární lymfocyty, které vykazují cytotoxické vlastnosti vůči buňkám, které byly napadeny virem, prvokem, či podlehly maligní transformaci. Také se díky svým cytotoxickým vlastnostem podílí na regulaci množství, či aktivity dalších buněk imunitního systému. NK buňky na svém povrchu exprimují množství aktivačních a inhibičních receptorů, mezi jejichž signály panuje dynamická rovnováha, která rozhoduje o životě a smrti cílové buňky. Pokud převáží aktivační signály, bude cílová buňka eliminována. Pokud převáží inhibiční signály, cytotoxická odpověď se nespustí.

Receptor NKp30 je jedním z důležitých aktivačních receptorů, jehož zapojení je pro správné rozpoznání a eliminaci cílové buňky v mnoha případech klíčové. Tento receptor je aktivován řadou ligandů, mezi které patří ligandy jak virového, bakteriálního a parazitárního původu, tak ligandy produkované nádorovými buňkami. Nově objeveným ligandem NKp30 je pak galektin-3, který po vytvoření ligand-receptorového komplexu inhibuje aktivaci NK buňky. Galektin-3 je exprimován celou řadou buněk v lidském organismu, také se nachází v některých rakovinných buňkách, kde je jeho exprese často zvýšena nad fyziologickou hranici. Pokud se galektin-3 dostane do extracelulárního prostoru, může inhibicí receptoru NKp30 přispět k úniku nádoru před imunitním systémem.

Receptor NKp30 je schopen za určitých podmínek v roztoku oligomerizovat. První podmínkou je přítomnost „stalk“ domény, druhou podmínkou je pak přítomnost N-glykosylace. Cílem této práce bylo ověřit vliv přítomnosti sacharid rozpoznávající domény galektinu-3 na disociaci této oligomerní frakce pomocí analytické gelové permeační chromatografie a ověřit vazbu této domény na NKp30 v závislosti na druhu, či přítomnosti N-glykosylace.

## KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňky, Galektin-3, NKp30, HEK293T, HEK293S GnTI-, N-glykosylace

## ABSTRACT

NK cells are an important part of the innate immune system. These are large granular lymphocytes that exhibit cytotoxic properties against cells infected with a virus, or protozoan, or have undergone malignant transformation. Due to its cytotoxic properties, NK cells also participate in regulation of other immune cells and their activity. NK cells express several activating and inhibiting receptors on their surface. Between signals from those receptors is a dynamic balance that determines the life and death of the target cell. If activation signals predominate, the target cell will be eliminated. If the inhibitory signals predominate, the cytotoxic response will not be triggered.

The NKp30 receptor is one of the important activating receptors. Its involvement is in many cases crucial for the proper recognition and elimination of the target cell. Receptor NKp30 is activated by several ligands, including both viral, bacterial and parasitic ligands, as well as ligands produced by tumor cells. Galectin-3 is recently described ligand of NKp30, which inhibits its further activation upon formation of the ligand-receptor complex. Galectin-3 is expressed by a number of cells in the human body and it is also found in some cancer cells, where its expression is often increased above physiological levels. When galectin-3 enters the extracellular space, inhibition of the NKp30 receptor may contribute to tumor escape from the immune system.

The NKp30 receptor can oligomerize in solution under certain conditions. The first requirement for its oligomerization is the presence of stalk domain. The second requirement is the presence of N-glycosylation. The aim of this thesis was to characterize the effect of presence of the carbohydrate recognition domain of galectin-3 (*Gal-3-CRD*) on the dissociation of oligomeric fraction of NKp30 by analytical gel permeation chromatography. Another aim was to characterize the binding of Gal-3-CRD to NKp30 depending on the type, or presence of N-glycosylation of NKp30.

## KEY WORDS

NK cells, Galectin-3, NKp30, HEK293T, HEK293S GnTI-, N-glycosylation

## SEZNAM ZKRATEK

|                   |   |
|-------------------|---|
| °C                | stupeň Celsia, jednotka teploty   |
| × g               | násobek gravitačního zrychlení  |
| µg                | mikrogram, jednotka hmotnosti   |
| µl                | mikrolitr, jednotka objemu  |
| µm                | mikrometr, jednotka délky   |
| µM                | mikromolární, jednotka koncentrace  |
| (v/v)             | objem/objem   |
| (w/v)             | hmotnost/objem  |
| AA                | akrylamid   |
| APC               | antigen prezentující buňky, z <i>angl. antigen presenting cells</i>                                   |
| APS               | peroxodisíran amonný, z <i>angl. ammonium persulfate</i>  |
| AUC               | analytická ultracentrifugace  |
| bp                | počet párů bází, z <i>angl. base pairs</i>  |
| CBB R-250         | barvivo Coomassie Brilliant Blue R 250  |
| CD                | komplex antigenní diferenciační skupiny, z <i>angl. cluster of differentiation</i>                    |
| CDR               | oblast určující komplementaritu, z <i>angl. complementarity-determining region</i>                    |
| CRD               | sacharid rozpoznávající doména, z <i>angl. carbohydrate recognition domain</i>                        |
| DC                | dendritické buňky, z <i>angl. dendritic cells</i>   |
| dH <sub>2</sub> O | deionizovaná voda   |
| DMSO              | dimethylsulfoxid  |
| DNA               | deoxyribonukleová kyselina, z <i>angl. deoxyribonucleic acid</i>                                      |
| dNTP              | deoxyribonukleosidtrifosfáty, z <i>angl. deoxyribonucleoside triphosphate</i>                         |
| EDTA              | kyselina ethylendiamintetraoctová, z <i>angl. ethylenediaminetetraacetic acid</i>                     |
| EndoF1-GST        | endoglykosidasa F1 ve fúzi s glutathion-S-transferasou  |
| g                 | gram, jednotka hmotnosti  |
| Gal-3-CRD         | sacharid rozpoznávající doména galektinu-3, z <i>angl. galectin-3 carbohydrate recognition domain</i> |
| Gal-3-WT          | nativní typ galektinu-3, z <i>angl. galectin-3 wild type</i>  |
| GPC               | gelová permeační chromatografie   |
| h                 | hodina, jednotka času   |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| HEK293S GnTI <sup>-</sup> | suspennzí lidská embryonální ledvinná linie 293, bez aktivity N-acetyl-glukosaminyltransferasy I, <i>z angl. human embryonic kidney 293 suspension culture, N-acetyl-glucosaminyltransferase I</i> |
| HEK293T                   | lidská embryonální ledvinná linie 293, exprimující mutovanou variantu velkého T antigenu SV40, <i>z angl. human embryonic kidney 293, expressing a mutant version of the SV40 large T antigen</i>  |
| HeLa                      | nádorové buňky Henrietty Lacksové  |
| HEPES                     | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina  |
| HF                        | vysoká přesnost, <i>z angl. high fidelity</i>  |
| HLA                       | lidský leukocytární antigen, <i>z angl. human leukocyte antigen</i>  |
| HPLC                      | vysokoúčinná kapalinová chromatografie, <i>z angl. high performance liquid chromatography</i>  |
| IFN                       | interferon   |
| Ig-like                   | označení imunoglobulinům podobných receptorů, <i>z angl. immunoglobulin-like</i>   |
| IL                        | interleukin  |
| IPTG                      | isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid   |
| ITAM                      | imunoreceptorový motiv založený na tyrosinu, <i>z angl. immunereceptor tyrosine-based activating motif</i>   |
| kb                        | počet kilobází   |
| kDa                       | kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti  |
| KIR                       | NK-buněčné imunoglobulinům podobné receptory, <i>z angl. killer immunoglobulin-like receptors</i>  |
| l                         | litr, jednotka objemu  |
| LB                        | kultivační médium, <i>z angl. lysogeny broth</i>   |
| LBD                       | ligand vázající doména, <i>z angl. ligand binding domain</i>   |
| LBD D                     | deglykosylovaná ligand vázající doména receptoru NKp30, <i>z angl. deglycosylated ligand binding domain</i>  |
| LBD S                     | ligand vázající doména receptoru NKp30 produkovaná v buněčné linii HEK293S GnTI <sup>-</sup>   |
| LBD T                     | ligand vázající doména receptoru NKp30 produkované v buněčné linii HEK293T   |
| LFC                       | klonování bez ligace, <i>z angl. ligation-free cloning</i>   |
| IPEI                      | lineární polyethylenimin   |
| M                         | molární, jednotka koncentrace  |
| MHC                       | hlavní histokompatibilní komplex, <i>z anlg. major histocompatibility complex</i>  |

|                   |  |
|-------------------|--|
| MICA              | glykoprotein hlavní histokompatibilitní komplex I. třídy – sekvence související s polypeptidem A, z <i>angl. MHC class I. polypeptide-related sequence A</i> |
| min               | počet minut, jednotka času   |
| ml                | mililitr, jednotka objemu  |
| mM                | milimolární, jednotka koncentrace  |
| mRNA              | mediátorová ribonukleová kyselina, z <i>angl. messenger ribonucleic acid</i>   |
| MWCO              | maximální hodnota molekulové hmotnosti, kterou daná membrána propustí, z <i>angl. molecular weight cut off</i>   |
| NCR               | receptor přirozené cytotoxicity, z <i>angl. natural cytotoxicity receptor</i>  |
| ng                | nanogram, jednotka hmotnosti   |
| NK buňky          | přirozeně zabijácké buňky, z <i>angl. natural killer cells</i>   |
| NKG2              | skupina přirozených zabijáckých receptorů 2, z <i>angl. natural killer group 2</i>   |
| NKp               | přirozený zabijácký protein, z <i>angl. natural killer protein</i>   |
| NKp30-LBD         | obecné označení jakékoli varianty ligand vázající domény receptoru NKp30   |
| NKp30-Stalk       | obecné označení jakékoli varianty receptoru NKp30 se „stalk“ doménou   |
| NKp30 Stalk D     | deglykosylovaná varianta receptoru NKp30 se „stalk“ doménou  |
| NKp30 Stalk S     | varianta receptoru NKp30 produkovaná v buněčné linii HEK293S GnTI <sup>-</sup>   |
| NKp30 Stalk T     | varianta receptoru NKp30 produkovaná v buněčné linii HEK293T   |
| OD <sub>500</sub> | optická denzita při 500 nm   |
| PBS               | fosfátem pufovaný fyziologický roztok, z <i>angl. phosphate buffered saline</i>  |
| PCR               | polymerasová řetězová reakce, z <i>angl. polymerase chain reaction</i>   |
| PDB               | proteinová databanka   |
| PPCO              | kopolymer polypropylenu, z <i>angl. polypropylene copolymer</i>  |
| RPM               | otáčky za minutu, z <i>angl. revolutions per minute</i>  |
| s                 | sekunda, jednotka času   |
| SDS               | dodecylsírán sodný, z <i>angl. sodium dodecyl sulfate</i>  |
| SDS-PAGE          | polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným, z <i>angl. sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>                          |
| SOB               | kultivační médium, z <i>angl. super optimal broth</i>  |
| TAE               | pufr, který obsahuje Tris, kyselinou octovou a kyselinou ethylendiamintetraoctovou   |



|       |   |
|-------|---|
| TEMED | tetramethylethyldiamin  |
| TES   | fyziologický roztok obsahující Trisa a ethylendiamintetraoctovou kyselinu |
| TK    | tkáňové kultury   |
| TNF   | faktor nádorové nekrózy, z <i>angl. tumor necrosis factor</i>             |
| Tris  | trihydroxymethylaminomethan   |
| U     | jednotka pro danou veličinu, z <i>angl. unit</i>                          |
| V     | volt, jednotka napětí   |

# OBSAH

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1       | Teoretický úvod .....   | 13 |
| 1.1     | Imunitní systém .....   | 13 |
| 1.1.1   | Adaptivní a vrozená imunita .....                             | 13 |
| 1.1.2   | NK buňky .....  | 14 |
| 1.1.2.1 | Receptory NK buněk .....                                      | 15 |
| 1.1.2.2 | Receptor přirozené cytotoxicity NKp30 .....                   | 16 |
| 1.2     | Lektiny .....   | 20 |
| 1.2.1   | Galektiny .....   | 21 |
| 1.2.1.1 | Galektin-3 .....  | 23 |
| 1.2.1.2 | Galektin-3 – ligand receptoru NKp30 .....                     | 25 |
| 2       | Cíle práce .....  | 26 |
| 3       | Materiál .....  | 27 |
| 3.1     | Přístroje a pomůcky .....                                     | 27 |
| 3.2     | Enzymy .....  | 29 |
| 3.3     | Pufry pro enzymy .....  | 29 |
| 3.4     | Buněčné linie a bakteriální kmeny .....                       | 29 |
| 3.5     | DNA .....   | 29 |
| 3.5.1   | Vektory .....   | 29 |
| 3.5.2   | Oligonukleotidy pro PCR a sekvenaci .....                     | 30 |
| 3.6     | Kultivační média .....  | 30 |
| 3.7     | Roztoky .....   | 30 |
| 3.7.1   | Roztoky pro SDS-PAGE a agarosovou elektroforézu .....         | 30 |
| 3.7.2   | Roztoky pro purifikaci a manipulaci s proteiny .....          | 31 |
| 3.7.3   | Roztoky pro manipulaci s buňkami .....                        | 31 |
| 3.8     | Chemikálie .....  | 31 |
| 4       | Metody .....  | 34 |
| 4.1     | Příprava expresního vektoru s genem pro Gal-3-CRD .....       | 34 |
| 4.1.1   | PCR – amplifikace úseku DNA .....                             | 34 |
| 4.1.2   | Agarosová elektroforéza .....                                 | 34 |
| 4.1.2.1 | Příprava agarosového gelu .....                               | 34 |
| 4.1.2.2 | Příprava vzorků a podmínky elektroforézy .....                | 35 |
| 4.1.3   | Izolace DNA z agarosového gelu pomocí komerční soupravy ..... | 35 |
| 4.1.4   | Štěpení plazmidu restričními endonukleasami .....             | 35 |
| 4.1.5   | Transformace plazmidu do kompetentních buněk bez ligace ..... | 36 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.1.5.1 | Příprava směsi pro transformaci kompetentních buněk bez ligace ...  | 36 |
| 4.1.5.2 | Transformace kompetentních buněk bez ligace .....   | 36 |
| 4.1.6   | PCR z bakteriálních kolonií.....  | 36 |
| 4.1.7   | Nízkoobjemová extrakce plazmidu pomocí komerční soupravy.....   | 37 |
| 4.1.7.1 | Nízkoobjemová kultivace bakterií.....   | 37 |
| 4.1.7.2 | Nízkoobjemová extrakce plazmidu pomocí komerční soupravy .....  | 37 |
| 4.1.8   | Sekvenace DNA.....  | 37 |
| 4.1.8.1 | Příprava vzorků pro sekvenaci DNA.....  | 37 |
| 4.1.8.2 | Sekvenace DNA .....   | 38 |
| 4.1.9   | Vysokoobjemová extrakce plazmidu pomocí komerční soupravy .....   | 38 |
| 4.1.9.1 | Transformace kompetentních buněk .....  | 38 |
| 4.1.9.2 | Vysokoobjemová kultivace bakterií .....   | 38 |
| 4.1.9.3 | Vysokoobjemová extrakce plazmidu pomocí komerční soupravy....   | 38 |
| 4.1.10  | Měření koncentrace DNA.....   | 39 |
| 4.2     | Rekombinantní exprese a purifikace Gal-3-CRD .....  | 39 |
| 4.2.1   | Transformace kompetentních bakterií a produkce Gal-3-CRD.....   | 39 |
| 4.2.2   | Purifikace Gal-3-CRD na Laktosovo-Sepharosovoé koloně.....  | 40 |
| 4.2.3   | Dialýza Gal-3-CRD .....   | 40 |
| 4.3     | Rekombinantní exprese proteinů v savčích buněčných liniích HEK293S GnTI a HEK293T.....  | 41 |
| 4.3.1   | Určování koncentrace buněk .....  | 41 |
| 4.3.2   | Rekombinantní exprese NKp30-LBD Stabilně transfekovanými buněčnými liniemi HEK293S GnTI a HEK293T.....                        | 41 |
| 4.3.3   | Rekombinantní exprese NKp30-Stalk buněčnými liniemi HEK293S GnTI a HEK293T metodou vysokohustotní tranzientní transfekce..... | 42 |
| 4.3.4   | Sklízení buněk.....   | 42 |
| 4.3.5   | Purifikace proteinů s histidinovou kotvou.....  | 42 |
| 4.3.5.1 | Chelatační chromatografie.....  | 42 |
| 4.3.5.2 | Zkoncentrování proteinů .....   | 43 |
| 4.3.5.3 | Preparativní GPC.....   | 43 |
| 4.4     | Charakterizace proteinů .....   | 43 |
| 4.4.1   | Měření koncentrace proteinů .....   | 43 |
| 4.4.2   | SDS-PAGE .....  | 44 |
| 4.4.3   | Deglykosylace proteinů .....  | 45 |
| 4.4.4   | Analytická GPC .....  | 45 |
| 5       | Výsledky .....  | 46 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 5.1   | Sekvence exprimovaných proteinů .....   | 46 |
| 5.1.1 | Sekvence Gal-3-CRD .....  | 46 |
| 5.1.2 | Sekvence NKp30-Stalk a NKp30-LBD .....  | 46 |
| 5.2   | Příprava plazmidu pOPINE_Gal-3-CRD .....  | 47 |
| 5.2.1 | Příprava genu pro Gal-3-CRD .....   | 47 |
| 5.2.2 | Linearizace plazmidu pOPINE .....   | 47 |
| 5.2.3 | LFC a příprava zásobního množství plazmidu pOPINE_Gal-3-CRD.....  | 49 |
| 5.3   | Rekombinantní exprese a purifikace Gal-3-CRD .....  | 50 |
| 5.4   | Rekombinantní exprese a purifikace NKp30-LBD a NKp30-Stalk buněčnými liniemi HEK293S GnTI a HEK293T ..... | 51 |
| 5.5   | Deglykosylace LBD S a NKp30 Stalk S.....  | 53 |
| 5.6   | Charakterizace interakce Gal-3-CRD s variantami receptoru NKp30 pomocí analytické GPC .....               | 53 |
| 6     | Diskuze .....   | 56 |
| 7     | Závěr .....   | 58 |
| 8     | Seznam literatury .....   | 59 |

# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1 IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém je komplexní síť lymfatických orgánů, buněk a humorálních složek. Zajišťuje ochranu nejen proti mikroorganismům, které se do našeho těla mohou dostat vdechnutím, požitím, nebo dokonce skrz poškozenou pokožku, ale například i před tumorigenezí [1].

### 1.1.1 ADAPTIVNÍ A VROZENÁ IMUNITA

Imunitní systém lze rozdělit na získanou neboli adaptivní imunitu a na vrozenou imunitu, přičemž obě části spolu velmi úzce spolupracují. Adaptivní část se vyznačuje pomalejší odezvou na daný patogen a je reprezentována dvěma druhy specializovaných buněk, kterými jsou T buňky a B buňky [2]. Pomalejší odezva je způsobena mechanismem, kterým tyto buňky rozpoznávají cizorodé mikroorganismy. Děje se tak prostřednictvím široké škály antigen-specifických receptorů, jenž jsou exprimovány na povrchu těchto buněk. Přeskupování několika set genových prvků zárodečných linií umožňuje vznik desítek milionů různých antigenních receptorů [3], se specifitou pro miliardy antigenů.

T buňky vznikající v kostní dřeni a brzlíku, jejichž geny pro antigen-specifické receptory podstoupily rekombinaci, jsou nematurované, jelikož se zatím nesetkaly s antigenem. Proces maturace probíhá v lymfatických tkáních, kde se kromě T a B buněk nachází i antigen prezentující buňky (*APC*, z *angl. antigen presenting cells*), které na svém povrchu nesou antigen navázaný na hlavním histokompatibilitním komplexu (*MHC*, z *angl. major histocompatibility complex*), konkrétně na MHC glykoproteinu II. třídy. Od setkání s antigenem do aktivace buňky obvykle uplynou 2-3 dny, během kterých dochází k zvětšení jejich populace [1,2]. B buňky vznikají především v kostní dřeni a jejich úlohou je tvořit protilátky, nicméně v jejich raných stádiích vývoje mohou hrát roli APC pro T buňky [1,4].

Kvůli pomalé odezvě adaptivního imunitního systému by měl daný patogen dostatek času k způsobení masivního poškození napadeného organismu. Proto je od počátku infekce patogen likvidován složkami vrozeného imunitního systému, mezi které patří například antimikrobiální peptidy, fagocytující buňky a cesty aktivace komplementu. Na rozdíl od adaptivního imunitního systému, který využívá možnost exprese téměř neomezeného množství antigen-specifických receptorů, se buňky vrozeného imunitního systému zaměřují na expresi několika stovek receptorů specifických pro vysoce konzervované struktury, které bývají společné pro větší skupiny

mikroorganismů. Likvidace původců infekce ovšem není jedinou rolí vrozeného imunitního systému [2]. Důležitou roli hrají buňky známé pod názvem „přirození zabijáci“ (*NK buňky*, z *angl. natural killer cells*), které vykazují přirozenou cytotoxicitu vůči buňkám, které podlely maligní transformaci, nebo byly napadeny virem [3,5].

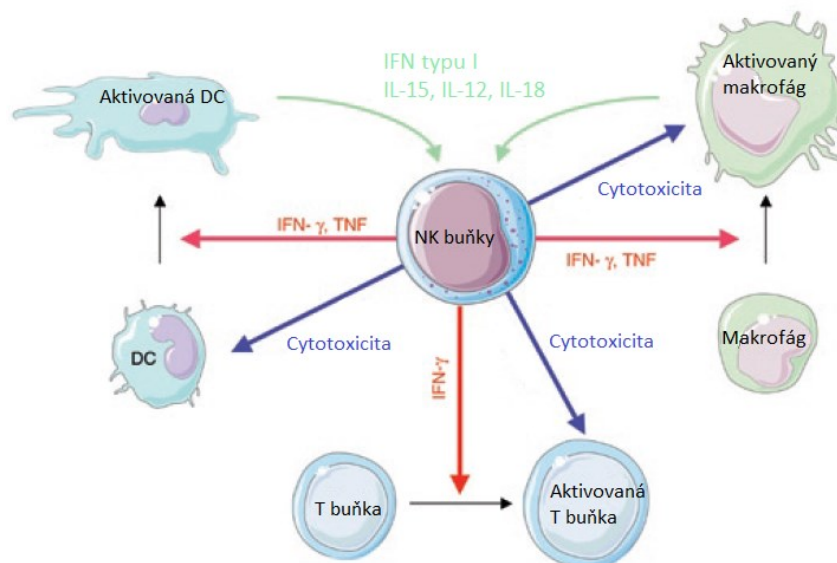
### 1.1.2 NK BUŇKY

NK buňky jsou velké granulární lymfocyty, které se diferencují z hematopoetických progenitorových buněk v kostní dřeni. Pro jejich růst a diferenciaci jsou zapotřebí různé cytokiny, zejména interleukin (*IL*) 2 a IL-15, jenž jsou produkovány jinými buňkami imunitního systému [6,7].

V lidském organismu se vyskytují ve dvou populacích, do kterých jsou řazeny podle fenotypizace jejich buněčného povrchu. Důležitým fenotypickým znakem všech NK buněk je absence komplexu antigenní diferenciací skupiny (*CD*, z *angl. cluster of differentiation*) číslo 3 (*CD3*), který je typický zejména pro T buňky, a exprese adhezí molekuly *CD56* [8]. Na základě hustoty výskytu *CD56* se pak NK buňky dělí na populaci *CD56<sup>bright</sup>*, která se vyznačuje vysokou expresí této molekuly, a *CD56<sup>dim</sup>*, která tuto molekulu exprimuje méně [5,8].

Jedním z hlavních rozdílů mezi těmito dvěma populacemi je jejich místo výskytu, kdy se *CD56<sup>bright</sup>* vyskytuje především v lymfatických orgánech, zatímco *CD56<sup>dim</sup>* je tvořena především buňkami, které cirkulují v krvi [9]. Dalším důležitým rozdílem je pak schopnost eliminace cílové buňky. Populace *CD56<sup>bright</sup>* slouží především k produkci cytokinů, například interferonu (*IFN*)  $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ), faktoru nádorové nekrózy (*TNF*, z *angl. tumor necrosis factor*)  $\beta$  (*TNF- $\beta$* ), IL-10 a IL-13, které zprostředkovávají komunikaci s dalšími buňkami imunitního systému (Obrázek 1, str. 15). Na rozdíl od *CD56<sup>dim</sup>* však mají mnohem nižší schopnost eliminovat buňky, kterými jsou aktivovány, nicméně *CD56<sup>bright</sup>* aktivované IL-2 a IL-12 vykazovaly obdobnou schopnost cytotoxicity jako *CD56<sup>dim</sup>* [10]. Kromě likvidace buněk, které podlely maligní transformaci, či byly napadeny virem jsou NK buňky také odpovědné za regulaci množství ostatních buněk imunitního systému, například dendritických buněk (*DC*, z *angl. dendritic cells*), aktivovaných makrofágů a aktivovaných T buněk (Obrázek 1, str. 15) [5].

Bylo také zjištěno, že některé NK buňky se po setkání s jejich aktivátory změní pod vlivem IL-12, *IFN- $\gamma$*  a *IFN- $\alpha$*  na paměťové NK buňky, které jsou schopny po opětovném setkání s aktivátorem rychlejší a razantnější odpovědi, ať už ve formě produkce cytokinů, či cytotoxické aktivity [11,12].



**Obrázek 1: Schéma ovlivňování imunitního systému NK buňkami**

NK buňky jsou schopny pomocí sekrece cytokinů, hlavně tedy IFN- $\gamma$  a TNF, aktivovat T buňky, DC a makrofágy. V případě potřeby poté mohou likvidovat aktivované T buňky, aktivované DC a aktivované makrofágy. Tyto funkce NK buněk jsou zpětně regulovány cytokiny, a to hlavně IFN typu I., mezi něž patří například IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  a další. Další cytokiny, které zpětně regulují funkce NK buněk jsou IL-15, IL-12 a IL-18, sekretované aktivovanými DC a aktivovanými makrofágy. Převzato a upraveno z [5].

#### 1.1.2.1 RECEPTORY NK BUNĚK

Jak již bylo zmíněno výše, NK buňky na rozdíl od T a B buněk nepodstupují přeskládání genů kódující antigen-specifické receptory. Místo toho exprimují menší počet aktivačních a inhibičních receptorů, které rozpoznávají různé ligandy, jako například MHC glykoproteiny I. třídy [13]. Obecně se receptory NK buněk dělí na dvě hlavní strukturní superrodiny – receptory podobné lektinům C-typu a imunoglobulinům podobné receptory (*Ig-like*, z *angl. immunoglobulin-like*), přičemž obě superrodiny zahrnují jak inhibiční, tak aktivační receptory [14].

Inhibiční receptory lidských NK buněk se dělí na další skupiny. První skupinu tvoří transkripty podobné imunoglobulinům 2, které jsou schopny vázat řadu ligandů. Druhou skupinou jsou inhibiční NK-buněčné imunoglobulinům podobné receptory (*KIR*, z *angl. killer immunoglobulin-like receptor*). Ligandy KIR jsou především lidské leukocytární antigeny (*HLA*, z *angl. human leukocyte antigen*), což je podskupina MHC glykoproteinů I. třídy, nacházející se pouze v lidském organismu [15]. Z toho vyplývá, že jak inhibiční, tak níže zmíněné aktivační KIR receptory jsou přítomny pouze v lidském organismu, potažmo v primátech. Skupina KIR je v myších nahrazena strukturně odlišnou skupinou receptorů Ly49 [16].

Lidské NK buňky pak také exprimují mnoho aktivačních receptorů, mezi které patří skupina aktivačních KIR, dále receptor přirozený zabijácký protein (*NKp*, z *angl. natural killer protein*) 80, člen D ze skupiny přirozených zabijáckých receptorů 2 (*NKG2*, z *angl. natural killer group 2*) – *NKG2D*, který patří stejně jako *NKp80* do superrodiny receptorů podobných lektinům C-typu. Další skupinou jsou pak receptory přirozené cytotoxicity (*NCR*, z *angl. natural cytotoxicity receptor*), z Ig-like superrodiny, mezi které patří *NKp30* (Obrázek 2, str. 17), *NKp44* a *NKp46* [14,15].

Mezi signály zprostředkovanými inhibičními a aktivačními receptory panuje dynamická rovnováha. Pokud NK buňka získá více inhibičních a aktivačních signálů z buňky, do jejíž blízkosti se dostala, tak o jejím dalším osudu rozhoduje priorita a četnost jednotlivých signálů. Jedním z hlavních aspektů, který rozhoduje mezi životem a smrtí cílové buňky, je její exprese MHC glykoproteinů I. třídy a jejich rozpoznání především inhibičními receptory ze skupin KIR i *NKG2*. V případě, že cílová buňka exprimuje těchto molekul málo, pak převáží aktivační signály a cílová buňka bude eliminována působením perforinu a granzymu B [5,8,17].

Bylo také zjištěno, že počet exprimovaných receptorů rozpoznávajících MHC glykoproteiny I. třídy, může ovlivnit cytotoxickou odpověď. NK buňky, které exprimovaly těchto receptorů málo, vykazovaly vyšší toleranci vůči buňkám deficientním na MHC glykoprotein I. třídy [18]. Zároveň NK buňky nejeví známky aktivace vůči buňkám deficientním na MHC glykoprotein II. třídy [19].

#### 1.1.2.2 RECEPTOR PŘIROZENÉ CYTOTOXICITY *NKp30*

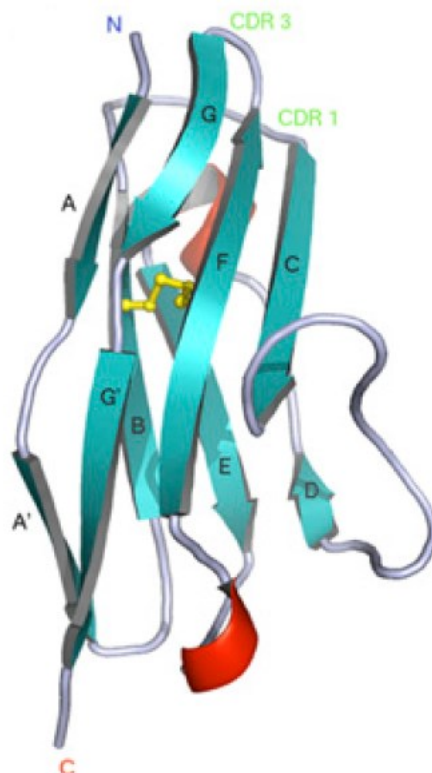
Receptor *NKp30* (Obrázek 2, str. 17), člen skupiny *NCR* o molekulové hmotnosti 30 kDa, který je někdy také nazýván *NCR3*, či *CD337*, je exprimován především NK buňkami, ovšem pod vlivem *IL-15* může být také exprimován v T buňkách pupečnickové krve, či epiteliálními buňkami za působení progesteronu. Zapojuje se především do rozpoznávání tumorových buněk, ale je známo i několik jeho virových ligandů, či dokonce vykazuje schopnost vazby na erytrocyty infikované *Plasmodium falciparum* [20], nebo také může indukovat apoptózu DC [13,16,20].

Jeho gen se nachází na vysoce polymorfním telomerním konci lidského MHC lokusu III. třídy a je exprimován v šesti formách sestříhu jeho mediátorové ribonukleové kyseliny (*mRNA*, z *angl. messenger ribonucleic acid*), přičemž první tři kódují *NKp30a*, *NKp30b* a *NKp30c*, jejichž extracelulární domény jsou podobné variabilním doménám imunoglobulinů [15,20]. Další tři formy jeho sestříhu mRNA pak kódují *NKp30d*, *NKp30e* a *NKp30f*, jejichž extracelulární domény jsou podobné konstantním doménám imunoglobulinů [20]. Každá z izoform *NKp30* vyvolává u NK buňky jinou odpověď.



Například při aktivaci NKp30a a NKp30b dochází k sekreci IFN- $\gamma$ , zatímco NKp30c vyvolává sekreci IL-10, a tak působí imunosupresivně [15,20].

Strukturně obsahuje receptor NKp30 motivy imunoglobulinů, obvykle jednu jejich doménu V-typu [21], je tedy tvořen převážně  $\beta$ -skládanými listy, přičemž dva jsou propojeny disulfidickým můstkem mezi Cys-39 a Cys-108. Dále obsahuje dva krátké  $\alpha$ -helixy a dvě oblasti určující komplementaritu (*CDR*, z *angl. complementarity-determining region*) (Obrázek 2) [22].

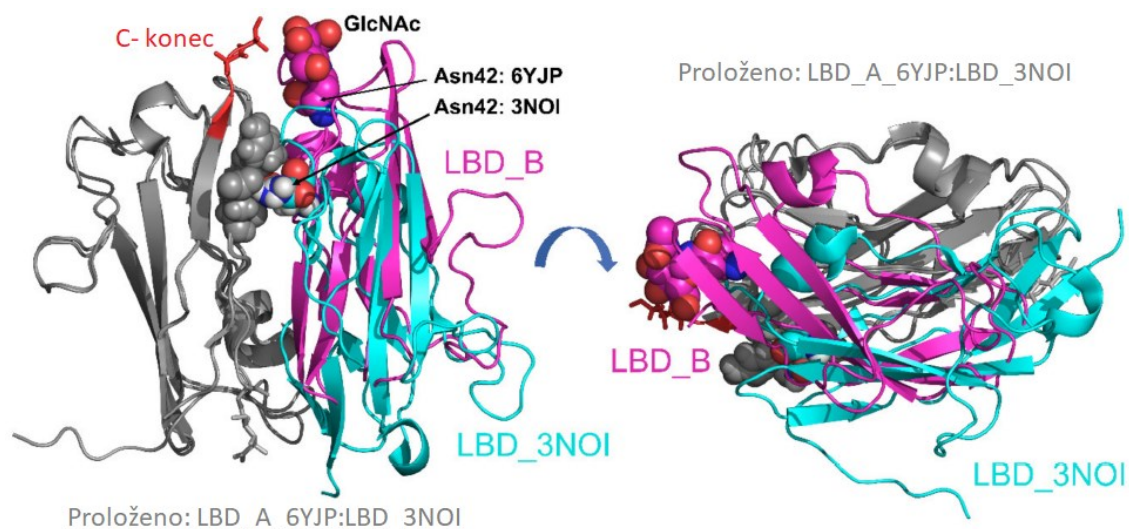


### Obrázek 2: Struktura neglykosylované ligand vázající domény receptoru NKp30

Receptor NKp30 [Kód v proteinové databance (*PDB*) 3NOI] obsahuje mnoho  $\beta$ -skládaných listů, které jsou obarveny tyrkysově. Sbalen je do tvaru variabilní domény imunoglobulinu, a to především prostřednictvím žlutě označeného disulfidického můstku, zprostředkovaného Cys-39 a Cys-108. Protein také obsahuje dva krátké červeně obarvené  $\alpha$ -helixy, jeden mezi listy D a E, druhý mezi listy E a F. Dále se ve struktuře nachází dva CDR, kterými se receptor váže na své ligandy. Písmenem C je pak označen C-konec proteinu a písmenem N jeho N-konec. Převzato a upraveno z [22].

Extracelulární doména obsahuje tři N-glykosylační místa, kterými jsou Asn-42 a Asn-68, které jsou pro funkci NKp30 stěžejní, zatímco N-glykosylační místo Asn-121 má na signalizaci a vazbu ligandů minimální vliv [23]. Kromě N-glykosylace jsou vazebné schopnosti receptoru také ovlivněny přítomností C-koncové „stalk“ domény obsahující 15 aminokyselin ( $^{129}\text{KEHPQLGAGTVLLR}^{143}$ ), kterou je propojena ligand

vázající doména (*LBD*, z *angl. ligand binding domain*) s transmembránovým  $\alpha$ -helixem, a stejně jako přítomnost N-glykosylace ovlivňuje oligomerizaci NKp30 [23-25]. Bylo zjištěno, že se jak N-glykosylovaná varianta LBD NKp30, tak varianta LBD NKp30 bez glykosylace, v roztoku nachází převážně v monomerní formě, kdy ale malá část také dimerizuje (Obrázek 3). Naopak N-glykosylovaný NKp30 exprimovaný se „stalk“ doménou oligomerizuje. Z porovnání konformací N-glykosylovaných a neglykosylovaných dimerů NKp30 bylo zjištěno, že některá aminokyselinová rezidua změnila svou polohu o 9-15 Å (Obrázek 3). N-glykosylovaný dimer LBD NKp30 může být základní stavební jednotkou oligomerů, které tvoří NKp30 se „stalk“ doménou [25].

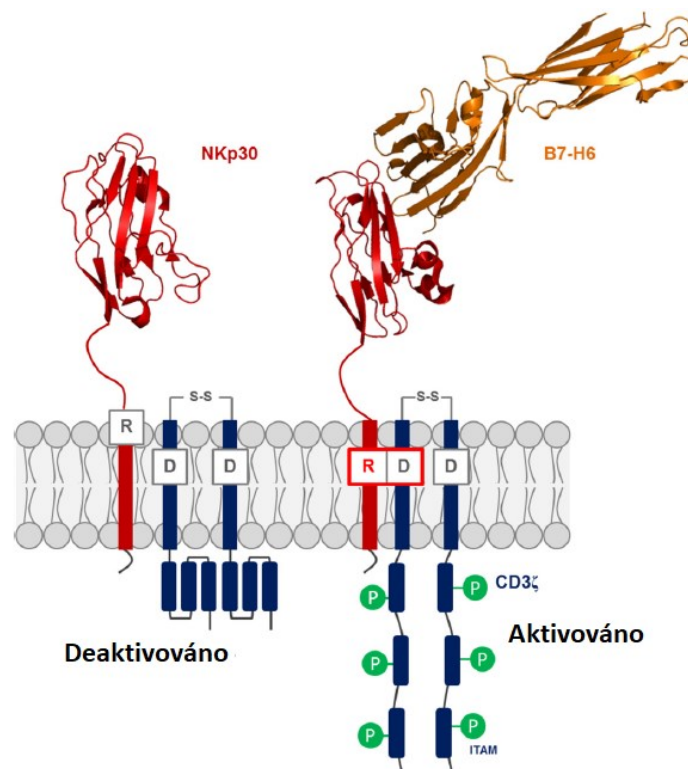


### Obrázek 3: Struktura dimeru LBD receptoru NKp30

Dvě molekuly LBD NKp30 dimerizují s 180° rotací vůči sobě („hlava k ocasu“). Šedivou barvou byla proložena monomerní jednotka neglykosylovaného dimeru (PDB kód 3NOI) s monomerní jednotkou N-glykosylovaného dimeru (PDB kód 6YJP) tak, aby se struktury co nejvíce překrývaly. Tyrkysovou barvou je pak vyznačena druhá monomerní jednotka neglykosylovaného dimeru (PDB kód 3NOI). Fialovou barvou je vyznačena druhá monomerní jednotka glykosylovaného dimeru (PDB kód 6YJP). Vlevo lze pozorovat, že se N-glykosylační místo Asn-42, které bylo zobrazeno sférickým modelem (spolu s navázaným N-acetylglukosaminem), nachází v případě N-glykosylovaného dimeru v blízkosti C-konce druhé monomerní jednotky. Naopak v případě neglykosylovaného dimeru se Asn-42 (taktéž zobrazený sférickým modelem) účastní interakce s druhou monomerní jednotkou. Vpravo byla celá struktura potočena, pro lepší pozorovatelnost změny konformace v závislosti na tom, zdali je dimer N-glykosylovaný či neglykosylovaný. Převzato a upraveno z [25].

Ligandy rozpoznávané NKp30 se dělí do několika skupin, a to na virové ligandy, mezi které patří například hemaglutinin viru vakcínie, či protein pp65 lidského cytomegaloviru. Další skupinou jsou pak bakteriální a parazitární ligandy, kdy je NKp30, přímo aktivován erytrocyty, jež byly napadeny prvokem *Plasmodium falciparum*. Nejrozšířenější skupinou jsou však celulární ligandy, mezi které patří heparan sulfátové

proteoglykany [20], HLA-B asociovaný transkript 3 (BAT3 či BAG6) [20,23], který je za normálních okolností přítomen pouze v jádru, ale tumorové a apoptotické buňky vykazují vyšší expresi genu pro BAT3, čímž se může dostat i do cytoplazmy [20]. Dalším důležitým celulárním ligandem je pak protein B7-H6, který ve zdravých tkáních není exprimován, zatímco tumorové buňky lymfomů, melanomů, leukemie, karcinomů či primární tumorové krevní buňky ho exprimují. Receptor NKp30 je jediný, který tento protein rozpoznává (Obrázek 4) [26]. Nejnovějším objeveným celulárním ligandem je pak galektin-3, protein nadměrně produkovaný některými tumorovými buňkami, který na receptor NKp30 působí inhibičně, čímž pomáhá nádoru odolávat imunitnímu systému [27].



**Obrázek 4: Schéma aktivace signalizace receptorem NKp30 pomocí ligandu B7-H6**

Vlevo je vidět červeně obarvený receptor NKp30 (PDB kód 3NOI) bez navázaného ligandu, jehož Arg-143 „stalk“ domény (R) neinteraguje s adaptorovou molekulou CD3ζ, která nese aktivační imunoreceptorové motivy založené na tyrosinu (*ITAM*, z *angl. immunereceptor tyrosine-based activating motif*). Transmembránové domény CD3ζ jsou propojeny disulfidickým můstkem. Napravo je pak ligand-receptorový komplex proteinu B7-H6, který je obarven oranžově, s NKp30 (PDB kód 3PV6). „Stalk“ doména nesoucí Arg-143 s kladně nabitým postranním řetězcem je v důsledku konformační změny receptoru způsobené nasazením ligandu nyní zasunuta hlouběji do membrány, čímž je umožněna interakce s adaptorovou molekulou CD3ζ, jejíž intracelulární části změnilы vlivem interakce s NKp30 svou konformaci a ITAM mohly být fosforylovány. Převzato a upraveno z [24].

Po nasednutí ligandu na receptor NKp30 se spouští signalizační kaskáda, ve které hraje důležitou roli C-koncová „stalk“ doména, konkrétněji kladně nabitý postranní řetězec Arg-143 [24]. Ten interaguje s adaptorovou molekulou, například CD3 $\zeta$ , která ve své aminokyselínové sekvenci nese ITAM (Obrázek 4, str. 19) [13,23,24].

Studie potvrdila, že NKp30 působí v synergii s NKp46, jelikož při testech na NK buňkách, jimž byl vždy monoklonálními protilátkami maskován pouze jeden z těchto dvou receptorů, docházelo k snížení cytotoxické aktivity v závislosti na druhu ligandu. Maskování obou receptorů pak vedlo k signifikantní inhibici cytotoxicity NK buňky [21].

## 1.2 LEKTINY

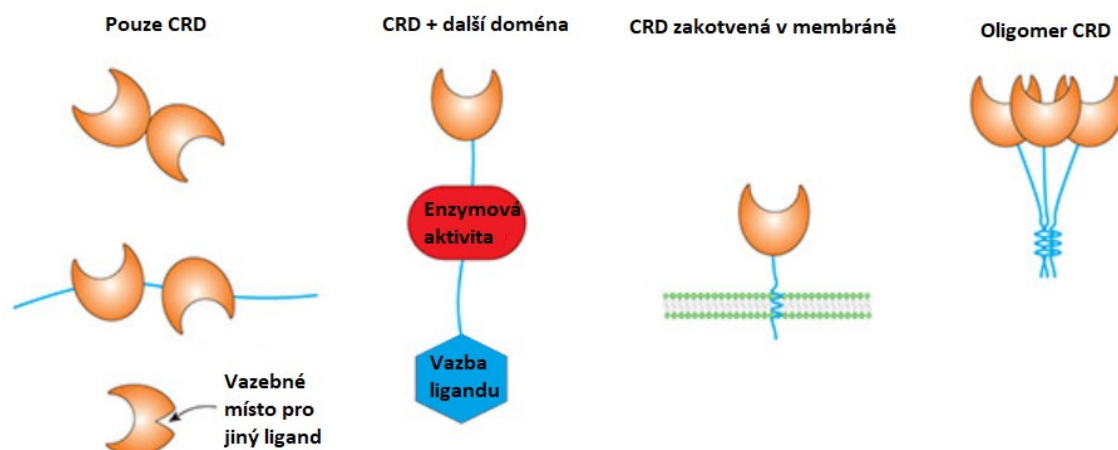
Lektiny jsou proteiny, které jsou schopny reverzibilně vázat monosacharidy a oligosacharidy, vyjma protilátek a enzymů. V přírodě hrají nejrůznější role, například rostlinné lektiny umožňují přichycení symbiotických bakterií, které fixují dusík. Lektiny živočichů pak například regulují migraci leukocytů organismem [28]. Každý lektin obsahuje sacharid rozpoznávající doménu (*CRD*, z *angl. carbohydrate recognition domain*) [29], přičemž může být tvořen pouze touto doménou, nebo může obsahovat i další části, které jsou zodpovědné například za uchycení k membráně, enzymatickou aktivitu či vazbu jiných ligandů (Obrázek 5, str. 21) [30]. Některé lektiny – aglutininy způsobují shlukování různých buněk [31,32], které je inhibovatelné volnými sacharidy. Zvláštním případem jsou pak hemaglutininy, které způsobují aglutinaci erytrocytů [32].

Lektiny lze rozdělit na jednoduché, vícedoménové a lektinové nadmolekulární struktury. Jedna z hlavních skupin lektinů, které se řadí mezi jednoduché, jsou lektiny luštěnin, jejichž důležitým zástupcem je konkanavalin A [29], který byl objeven mezi prvními. Velká část ostatních lektinů zaujímá podobnou konformaci jako konkanavalin A [33]. Další početnou skupinou jsou pak lektiny obilovin, mezi které patří například aglutinin z pšeničných klíčků. Jejich zajímavostí je, že na rozdíl od luštěninových lektinů, jsou bohaté na cystein. Za zmínku také stojí lektiny z čeledi rostlin pryšcovité, mezi které patří velmi známý ricin a aglutinin skočce obecného. Galektiny jsou další skupinou spadající pod jednoduché lektiny [29]. Nachází se jak v obratlovcích, zejména tedy savcích, tak v některých bezobratlých, rostlinách a houbách. Jejich CRD, které vykazují specifitu pro  $\beta$ -galaktosidy [34,35], jsou si napříč všemi zástupci galektinů velmi podobné [29,35].

Mezi vícedoménové lektiny patří skupina virových lektinů, jejichž zástupcem je například hemaglutinin viru chřipky [29,33]. Další skupinou jsou pak lektiny C-typu, které pro svou funkci potřebují vápenaté ionty [29]. Jejich konformace je mezi ostatními

lektiny velmi rozšířená, podobně jako tomu je u konkavalinu A [33]. Mezi lektiny C-typu se řadí podskupina endocytických lektinů, jako například ptačí hepatocytický lektin. Další podskupinou lektinů C-typu jsou kolektiny, mezi které patří například maltosu vázající protein. Poslední důležitou podskupinou jsou pak selektiny, které zprostředkovávají mezibuněčný kontakt. Lektiny P-typu jsou další skupinou vícedoménových lektinů, mezi které patří pouze dva zástupci, kterými jsou manosa-6-fosfátové receptory, přičemž první, s hmotností okolo 300 kDa, není závislý na přítomnosti vápenatých iontů, zatímco druhý, s hmotností okolo 45 kDa, závislý je [29]. Poslední skupinou vícedoménových lektinů jsou lektiny I-typu, které obsahují imunoglobulinům podobné domény. Nejdůležitějšími zástupci jsou sialoadheziny [36], mezi které patří například receptor makrofágů, který je zodpovědný za vazbu například na ovčí erytrocyty.

Lektiny se také mohou seskládat v nadmolekulární struktury, jako například fimbrie a pili, což jsou vláknité heteropolymery, které se nachází na povrchu bakterií a dosahují délky až 200 nm [29].



**Obrázek 5: Možnosti strukturního uspořádání lektinů**

Lektiny se mohou vyskytovat buď jako rozpustné CRD, případně rozpustné CRD s dalším vazebným místem, nebo mohou být spřaženy s enzymem či další samostatnou doménou, která je schopna vázat ligand. Existují také lektiny, které jsou zakotveny v membráně, nebo lektiny, jejichž CRD oligomezitují. Převzato a upraveno z [30].

### 1.2.1 GALEKTINY

Galektiny, jsou proteiny vykazující afinitu pro  $\beta$ -galaktosidy s výraznými sekvenčními podobnostmi jejich CRD. Nachází se ve všech živočišných říších, v rostlinách i v houbách. Dříve byly nazývány jako lektiny S-typu, a to kvůli závislosti jejich aktivity na přítomnosti thiolů. Od tohoto názvu bylo později ale upuštěno, jelikož se ukázalo, že tato podmínka neplatí pro každý galektin [35].

Dle organizace domén se galektiny dělí na tři základní typy. První jsou galektiny s jednou CRD, mezi něž patří galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 a -15. Dalším typem jsou galektiny s dvěma CRD, které jsou propojeny jedním peptidovým řetězcem s délkou do 70 aminokyselin, mezi které patří galektin-4, -6, -8, -9 a -12. Speciálním případem je pak galektin-3 (Obrázek 6, str. 24), který obsahuje jednu CRD, na kterou je připojena přibližně 120 aminokyselin dlouhá N-koncová doména [34]. Stručný přehled vybraných galektinů a jejich funkcí je uveden v tabulce 1.

**Tabulka 1: Stručný přehled vybraných funkcí některých galektinů.** Informace čerpány z [34].

| Organizace domén/y                  | Galektin | Vybrané funkce  |
|-------------------------------------|----------|---|
| <b>Jedna CRD</b>                    | 1        | Indukuje apoptózu aktivovaných T buněk<br>Potlačuje proliferaci B buněk   |
|                                     | 2        | Indukuje apoptózu T buněk   |
|                                     | 7        | Účastní se diferenciaci keratinocytů  |
|                                     | 10       | Hraje zásadní roli ve funkci regulačních T buněk  |
| <b>CRD s N-koncovou doménou</b>     | 3        | Účastní se sestřihu primárního transkriptu mRNA<br>Intracelulárně vykazuje antiapoptotickou aktivitu,<br>extracelulárně může indukovat apoptózu T buněk a monocyty<br>Podporuje růst nádorů |
| <b>Dvě CRD spojeny polypeptidem</b> | 4        | Účastní se formace lipidových raftů<br>Je vysoce exprimován během vzniku rakoviny   |
|                                     | 8        | Potlačuje migraci nádorových buněk<br>Zlepšuje adhezi neutrofilů  |
|                                     | 9        | Indukuje maturaci DC a produkci IL-12<br>Je chemoatraktantem pro eosinofily   |
|                                     | 12       | Indukuje apoptózu adipocytů, zároveň se účastní jejich diferenciaci<br>Účastní se regulace buněčného cyklu  |

Ačkoli galektiny neobsahují signální sekvenci, mohou být sekretovány. Řadí se tedy do skupiny sekretovaných proteinů bez signální sekvence. Kromě toho se mohou nacházet i v jádře a cytoplazmě [34].

Je evidentní, že některé galektiny hrají důležitou roli při nádorových onemocněních, a to hlavně kvůli jejich proapoptotickým a antiapoptotickým funkcím. Studie ukázaly, že inhibice exprese galektinu-3 v buňkách rakoviny prsu zpomalila jejich růst *in vivo*, zatímco galektin-1 může stejně jako galektin-7 autokrinně potlačovat růst buněk neuroblastomu, pokud je přidáván exogenně [37].

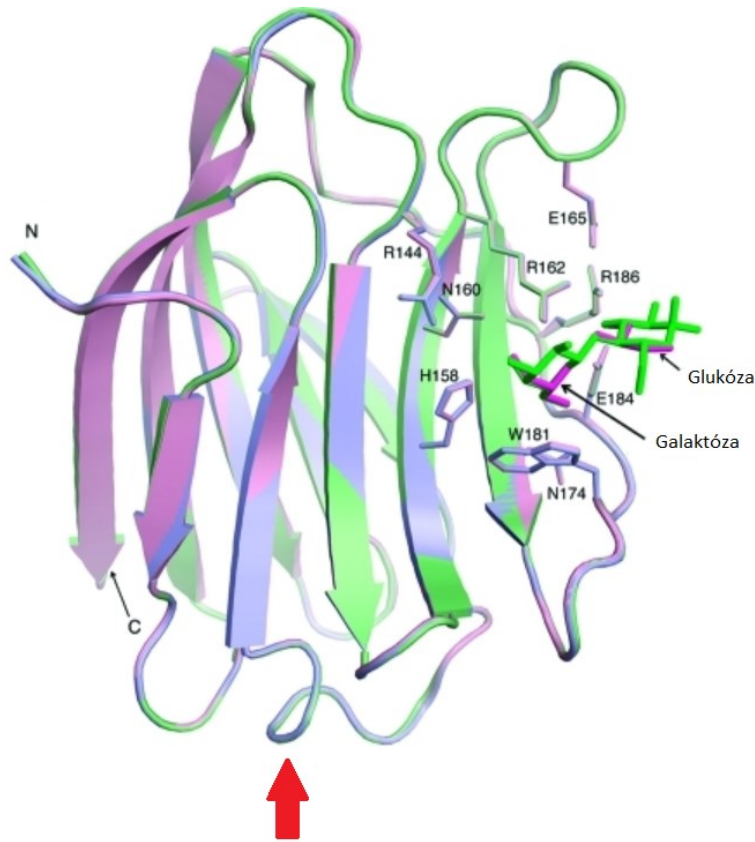
### 1.2.1.1 GALEKTIN-3

Galektin-3, protein o molekulové hmotnosti od 29 do 35 kDa, je jedním z nejstudovanějších lektinů ze skupiny galektinů. Nachází se v jádře, cytoplazmě, nebo může být sekretován mimo buňku. Je jediným galektinem, který kromě CRD, která se nachází na jeho C-konci, obsahuje také 110 až 130 aminokyselin dlouhou N-koncovou doménu [38], která díky repetitivním úsekům bohatých na glycin a prolin připomíná strukturu kolagenu [39]. Na rozdíl od flexibilní N-koncové domény je CRD globulární a obsahuje přibližně 130 aminokyselin, tvořících několik antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů (Obrázek 6, str. 24). Galektin-3 může skrze N-koncovou doménu nekovalentně oligomerizovat, naopak myši galektin-3 může skrze CRD, která obsahuje nespárovaný Cys-186, tvořit kovalentní dimery [38].

Preferovaným ligandem galektinu-3 je N-acetyllaktosamin, nicméně je schopen vázat mnoho dalších  $\beta$ -galaktosidů a dokonce existují i ligandy, se kterými galektin-3 interaguje skrze N-koncovou doménu. Interakce s ligandem je doprovázena konformační změnou galektinu-3 (Obrázek 6, str. 24) [38]. Afinita pro vazbu ligandů je silně ovlivněna fosforylací na Ser-6, který se nachází v N-koncové doméně. Dalším, méně důležitým fosforylačním místem je Ser-12 [40]. Fosforylace je zároveň jedinou známou posttranslační modifikací galektinu-3 [41], která výrazně snižuje afinitu k ligandům [40]. Ukázalo se také, že po proapoptotickém stimulu cisplatinou je galektin-3 exportován z jádra do cytoplazmy, kde působí antiapoptoticky. Jak pro export z jádra, tak pro antiapoptotickou aktivitu je nutná fosforylace na Ser-6. Antiapoptotická aktivita je zapříčiňována například inhibicí uvolnění cytochromu c z mitochondrií, které by aktivovalo kaspasy [41].

Galektin-3 je exprimován mnoha druhy buněk, například epiteliálními buňkami tenkého střeva, ledvin, plic a brzlíku. Také byl nalezen ve fibroblastech, chondrocytech, osteoblastech, osteoklastech a keratinocytech, či v buňkách imunitního systému, jako například v neutrofilech, eozinofilech, bazofilech, žírných buňkách a DC [38]. Exprimují ho i monocyty a makrofágy, pro které je zároveň chemoatraktantem [38,42]. Galektin-3 je také exprimován NK buňkami, které ho mohou sekretovat ve vezikulách společně s perforinem [43]. Podobně může být také sekretován v exozomech DC [38]. Často se také ve zvýšeném množství nachází v nádorových buňkách, například v melanomech, fibrosarkomech, v buňkách nádorů slinivky břišní, v buňkách leukemie a nádorů prsu. Naopak buňky nádorů vaječníků, prostaty a slinných žláz mívají expresi galektinu-3 sniženou [44]. V některých buněčných liniích koreloval metastatický potenciál nádoru s množstvím fosforylovaného galektinu-3 v cytoplazmě [40]. Bylo zjištěno, že kromě

antiapoptotické aktivity stimuluje v endoteliálních buňkách angiogenezi, čímž také může podporovat růst nádorů [45].



### Obrázek 6: Struktura sacharid rozpoznávající domény galektinu-3

Modrou barvou je označena konformace sacharid rozpoznávající domény galektinu-3 (*Gal-3-CRD*, z *angl. galectin-3 carbohydrate recognition domain*) bez vazby na sacharid (PDB kód 3ZSM), fialovou barvou je označena konformace za přítomnosti glycerolu (PDB kód 3ZSK) a zelenou je označena konformace při vazbě laktosy (PDB kód 3ZSJ), kdy je na obrázku vyznačena její poloha. Zvýrazněny jsou také postranní řetězce aminokyselin, které se účastní vazby ligandu. Z obrázku je zřejmé, že vazba ligandu způsobuje konformační změnu celé CRD, která je tvořena převážně  $\beta$ -skládanými listy a jedním krátkým  $\alpha$ -helixem, který byl označen červenou šipkou. Písmeny N a C je označen N-konec a C-konec proteinu. Převzato a upraveno z [46].

Galektin-3 je také zapojen do regulace buněčného cyklu. Stimuluje produkci cyklinu D<sub>1</sub> [37,47], což vede k překlenutí brzkého období fáze G<sub>1</sub>, kde je vysoké riziko apoptózy [47]. Dále stimuluje produkci inhibitorů cyklin-dependentních kinas a snižuje produkci cyklinu E a cyklinu A [37,47], které jsou zapojeny v přechodu z G<sub>1</sub> fáze do S fáze [37], čímž způsobuje zastavení buněčného cyklu v pozdní G<sub>1</sub> fázi [47]. Kromě účasti na regulaci buněčného cyklu se ukázalo, že vyšší koncentrace galektinu-3 mohou stimulovat buněčnou proliferaci [48].



### 1.2.1.2 GALEKTIN-3 – LIGAND RECEPTORU NKp30

Galektin-3 je jedním z ligandů receptoru NKp30. Vazba sekretovaného galektinu-3 na extracelulární doménu NKp30 způsobuje jeho inhibici, čímž snižuje cytotoxické schopnosti NK buněk [27]. Kromě inhibice receptoru NKp30, inhibuje také vazbu receptoru NKG2D na jeho ligand MHC glykoprotein I. třídy – sekvenci související s polypeptidem A (*MICA*, z angl. *MHC class I. polypeptide-related sequence A*). Galektin-3 se na MICA váže na vazebné místo receptoru NKG2D, čímž snižuje jeho afinitu k vazbě na MICA a tím snižuje cytotoxickou aktivitu NK buněk vůči cílovým buňkám s inhibovanými MICA [49].

Byla provedena studie, kde byly imunodeficientní myši očkovány variantami nádorových buněk Henrietty Lacksové (*HeLa*), které přirozeně galektin-3 exprimují. Variantami HeLa buněk, kterými byly myši očkovány, byly buňky s přirozenou expresí galektinu-3, s potlačenou expresí galektinu-3 a se zvýšenou expresí galektinu-3. Po pěti dnech byly do vzniklých nádorů vstříknuty geneticky upravené NK buňky, které neexprimovaly receptor NKG2D, aby byly potlačeny vlivy inhibice MICA. Výsledkem bylo značné snížení rychlosti růstu nádorů v případě HeLa buněk se sníženou expresí galektinu-3. Naopak galektin-3 nádorů tvořených HeLa buňkami s přirozenou a se zvýšenou expresí galektinu-3 NK buňky kompletně inhiboval, tím pádem nádory rostly rychleji. Galektin-3 je tedy významným regulátorem imunitní odpovědi NK buněk v boji proti nádorům [27].

## 2 CÍLE PRÁCE

- Příprava plazmidu nesoucího gen pro Gal-3-CRD a následná exprese Gal-3-CRD v bakteriích *E. coli* T7.
- Exprese variant receptoru NKp30 v lidských buněčných liniích HEK293S GnTI<sup>-</sup> a HEK293T.
- Ověření vazby Gal-3-CRD na varianty receptoru NKp30 v závislosti na druhu, či přítomnosti jejich N-glykosylace pomocí analytické GPC.
- Ověření vlivu Gal-3-CRD na oligomerní frakci NKp30.

### 3 MATERIÁL

#### 3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| Analytické váhy                                 | AND, USA                    |
| Automatické pipety                              | Discovery HTL, Polsko       |
| Automatické pipety                              | Pipetman Gilson, USA        |
| Automatický pipetovací nástavec Pipetus         | Hirschmann, Německo         |
| Automatický sběrač frakcí                       | Amersham Biosciences, UK    |
| Blokový termostat LS1                           | VLM, Německo                |
| Centrifuga Allegra X-22R                        | Beckman Coulter, USA        |
| Centrifugační kyvety 85 ml                      | Nalgene, USA                |
| Centrifugační kyvety 250 ml PPCO                | Nalgene, USA                |
| Centrifugační zkumavky Oak Ridge 50 ml          | Sigma-Aldrich, USA          |
| Centrifuga EBA 12R                              | Hettich, Německo            |
| Centrifuga Universal 320R                       | Hettich, Německo            |
| Dialyzační kazeta Slide-A-Lyzer G2 – MWCO 10000 | Thermo Fisher, USA          |
| Erlenmayerovy baňky 2l                          | Simax, ČSR                  |
| Filtry pro sterilizaci 0,22 µm                  | TPP, Švýcarsko              |
| Hemocytometr                                    | Sigma-Aldrich, USA          |
| HPLC systém ÄKTA basic                          | GE Healthcare, USA          |
| Inkubátor CO <sub>2</sub> MCO-18 AIC            | Sanyo, Japonsko             |
| Inkubátor IB-01E                                | JeioTech, Korea             |
| Kahan Fuego SCS                                 | VERKON, ČR                  |
| Kolona GStrapFF 5 ml                            | Cytiva, USA                 |
| Kolona HiTrap Talon Crude 5 ml                  | GE Healthcare, USA          |
| Kolona HiPrep 26/10 Desalting                   | Sigma-Aldrich, USA          |
| Kolona Laktosovo-Sepharosová                    | Galab Technologies, Německo |
| Kolona Superdex 75 Increase 10/300 GL           | Cytiva, USA                 |
| Kolona Superdex 200 10/300 GL                   | GE Healthcare, USA          |
| Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL          | GE Healthcare, USA          |
| Koncentrátory Amicon Ultra – MWCO 10000         | Millipore, USA              |
| Kónické zkumavky 50 ml 15 ml                    | VWR, USA                    |
| Lahve 1 l, 500 ml, 100 ml                       | P-LAB, ČR                   |

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| Lahve čtverhranné s prodyšnými víčky 1 l              | P-LAB, ČR                       |
| Laminární box Clean Air                               | PMV, Nizozemsko                 |
| Mikrocentrifuga miniStar silverline                   | VWR, USA                        |
| Mikroskop inverzní AE31                               | Motic, Německo                  |
| Mikrostříkačka HAMILTON                               | Hamilton, USA                   |
| Mikrozkumavky 1,5 ml                                  | Corning Incorporated, USA       |
| Mikrozkumavky pro PCR 500 µl                          | Sigma-Aldrich, USA              |
| Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)               | Sanyo, Japonsko                 |
| NucleoBond Xtra Maxi                                  | MACHEREY-NAGEL,<br>Německo      |
| Petriho misky   | Corning, Německo                |
| pH metr Φ 200   | Beckman Coulter, USA            |
| Plastik pro tkáňové kultury                           | Sigma-Aldrich, USA              |
| Předvážky KB1200-2                                    | Kern, Německo                   |
| Souprava pro agarosovou elektroforézu Liberty 120     | Biokeystone, USA                |
| Souprava pro izolaci DNA NucleoSpin Plasmid,          | MACHEREY-NAGEL,                 |
| Souprava pro izolaci DNA NucleoSpin Plasmid, mini kit | MACHEREY-NAGEL,<br>Německo      |
| Souprava pro izolaci DNA NucleoSpin Gel and PCR,      | MACHEREY-NAGEL,                 |
| Souprava pro klonování Ligation-Free Cloning Kit      | ABM, Kanada                     |
| Souprava pro SDS-PAGE                                 | Bio-Rad, Německo                |
| Spektrofotometr DS-11+                                | DeNovix, USA                    |
| Spektrofotometr Cary 60 UV-Vis                        | Agilent Technologies, USA       |
| Stříkačkový mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 µm       | Carl Roth, Německo              |
| Termocykler T100                                      | Bio-Rad, Německo                |
| Transiluminátor Dark Reader                           | Clare Chemical Research,<br>USA |
| Třepačka Celltron                                     | Infors HT, Švýcarsko            |
| Třepačka Multitron Pro                                | Infors HT, Švýcarsko            |
| Třepačka Mini Shaking Incubator                       | MIULAB, Čína                    |
| Třepačka Orbi-Safe TS                                 | Gallenkamp, UK                  |
| Ultrazvuková sonda Sonopuls                           | Bandelin, Německo               |
| Varič   | ETA, ČR                         |
| Vodní lázeň   | Memmert, Německo                |

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| Vortexový mixér                              | VELP Scientifica, Itálie         |
| Zdroj deionizované vody Milli Q              | Millipore, USA                   |
| Zdroj napětí EC250-90                        | E-C Apparatus Corporation,<br>UK |
| Zobrazovací zařízení Alliance Q9             | UVITEC, UK                       |
| <b>3.2 ENZYMY</b>                            |                                  |
| EndoF1-GST fúzní endoglykosidasa             | Mgr. Ondřej Skořepa, PřF UK, ČR  |
| Q5 DNA polymerasa                            | New England Biolabs, USA         |
| Restrikční endonukleasa NcoI-HF              | New England Biolabs, USA         |
| Restrikční endonukleasa PmeI                 | New England Biolabs, USA         |
| RNAsa A                                      | Lach-Ner, ČR                     |
| <b>3.3 PUFRY PRO ENZYMY</b>                  |                                  |
| CutSmart buffer pro restrikční endonukleasy  | New England Biolabs, USA         |
| Q5 reaction buffer                           | New England Biolabs, USA         |
| <b>3.4 BUNĚČNÉ LINIE A BAKTERIÁLNÍ KMENY</b> |                                  |
| <i>E. coli</i> DH5α                          | Invitrogen, USA                  |
| <i>E. coli</i> T7                            | New England Biolabs, USA         |
| <i>E. coli</i> TOP 10                        | Thermo Fisher, USA               |
| HEK293S GnTI                                 | ATCC, USA                        |
| HEK293T                                      | A. Radu Aricescu, UK             |
| <b>3.5 DNA</b>                               |                                  |
| <b>3.5.1 VEKTORY</b>                         |                                  |
| pOPINE                                       | OPPF, UK                         |
| pOPINE_Gal-3-WT                              | Mgr. Ondřej Skořepa, PřF UK, ČR  |
| pTW5-aFGF, pTW5-p27                          | E. Poláchová, PřF UK, ČR         |
| pTW5sec_NKp30_Stalk                          | Mgr. Ondřej Skořepa, PřF UK, ČR  |

### 3.5.2 OLIGONUKLEOTIDY PRO PCR A SEKVENACI

Přímý primer pOPINE\_Gal-3-CRD\_FW

5'- AGGAGATATACCATGCCGCTGATTGTTCCGTATAATCTG -3'

Reverzní primer pOPINE\_Gal-3-CRD\_REV

5'- GTGATGGTGATGTTTTTAGATCATGGTATAGCTTGCG -3'

Přímý sekvenační primer opinEF\_FW

5'- GGACCGAAATTAATACGACTC -3'

Reverzní sekvenační primer pTT\_REV

5'- TATGTCCTTCCGAGTGAGAG -3'

### 3.6 KULTIVAČNÍ MÉDIA

|                 |  |
|-----------------|--|
| ExCell293       | Komerčně dostupné médium (Sigma, USA), před použitím doplněn L-glutamin do 4mM koncentrace                         |
| LB + ampicilin  | LB médium + ampicilin o koncentraci 100 µg/ml  |
| LB médium       | 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4  |
| SOB médium      | 2% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgSO <sub>4</sub> , 10mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,0 |
| SOB + ampicilin | SOB médium + ampicilin o koncentraci 100 µg/ml   |

### 3.7 ROZTOKY

#### 3.7.1 ROZTOKY PRO SDS-PAGE A AGAROSOVOU ELEKTROFORÉZU

Barvicí roztok pro SDS-PAGE

45% methanol, 10% kyselina octová, 0,25% CBB R 250

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE 10× konc.

0,25M Tris, 1,9M glycin, 1% (w/v) SDS, pH 8,3

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE

35% ethanol, 10% kyselina octová

Pufr TAE pro agarosovou elektroforézu

40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA

Roztok AA pro SDS-PAGE

29% AA, 1% N,N'-methylenbisakrylamid

Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu

Gel loading dye, Purple (6x) New England Biolabs, USA

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. neredukující

31,5mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 10mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. redukující

Vznikl přidáním 100 µl 2-merkptoethanolu k 900 µl 5× konc. neredukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE "

### 3.7.2 ROZTOKY PRO PURIFIKACI A MANIPULACI S PROTEINY

|   |   |
|---|---|
| Dialyzační roztok                             | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN <sub>3</sub> , pH 7,5  |
| Eluční pufr pro Laktosovo-Sepharosovou kolonu | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN <sub>3</sub> , 200mM laktosa, pH 7,5                               |
| Eluční pufr pro Talon                         | 50mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 300mM NaCl, 10mM NaN <sub>3</sub> , 250 mM imidazol, pH 7,5 |
| Mobilní fáze pro GPC (HEPES)                  | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN <sub>3</sub> , pH 7,5  |
| Octanový pufr                                 | 20 mM octan sodný, 150 mM NaCl, 10 mM NaN <sub>3</sub> , pH 4                                       |

### 3.7.3 ROZTOKY PRO MANIPULACI S BUŇKAMI

|                        |  |
|------------------------|--|
| PBS                    | 50mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 300mM NaCl, 10mM NaN <sub>3</sub> , pH = 7,0                       |
| PBS-TK                 | 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 150mM NaCl, 2mM KCl, 10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0 |
| Roztok trypanové modři | 0,4% trypanová modř v PBS-TK   |
| TES                    | 10mM Tris, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM NaN <sub>3</sub> , pH 8,0   |

### 3.8 CHEMIKÁLIE

|                                |                          |
|--------------------------------|--------------------------|
| 1 kb DNA standard              | New England Biolabs, USA |
| 100 bp DNA standard            | New England Biolabs, USA |
| 2-merkapt ethanol              | Sigma-Aldrich, USA       |
| AA                             | Sigma-Aldrich, USA       |
| Agar                           | Oxoid, Anglie            |
| Agarosa                        | Sigma-Aldrich, USA       |
| Ampicilin                      | Biotika, SR              |
| APS                            | Sigma-Aldrich, USA       |
| Azid sodný                     | Sigma-Aldrich, USA       |
| Bromfenolová modř              | Lachema, ČR              |
| CBB R-250                      | Fluka Chemika, Švýcarsko |
| Combi PPP Master Mix           | Top-Bio, ČR              |
| Dihydrogenfosforečnan draselný | Lach-Ner, ČR             |
| Dihydrogenfosforečnan sodný    | Lach-Ner, ČR             |
| DMSO                           | New England Biolabs, USA |
| dNTP                           | Top-Bio, ČR              |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Doxycyklin  | Serva, USA               |
| EDTA  | Jersey Lab Supply, USA   |
| Ethanol   | Lach-Ner, ČR             |
| Ethanol denaturovaný  | Lach-Ner, ČR             |
| Fenylmethylsulfonylfluorid  | SERVA, Německo           |
| Glycerol  | Lach-Ner, ČR             |
| Good View II  | Ecoli, SR                |
| HEPES   | Sigma-Aldrich, USA       |
| Hydrogenfosforečnan sodný   | Lach-Ner, ČR             |
| Hydroxid sodný  | Penta, ČR                |
| Chlorid draselný  | Lach-Ner, ČR             |
| Chlorid hořečnatý   | Lach-Ner, ČR             |
| Chlorid sodný   | Lach-Ner, ČR             |
| Imidazol  | Carl Roth, Německo       |
| IPTG  | Sigma-Aldrich, USA       |
| Isopropanol   | Lach-Ner, ČR             |
| Kvasničný extrakt   | Imuna Pharm, SR          |
| Kyselina chlorovodíková   | Lach-Ner, ČR             |
| Kyselina octová   | Lach-Ner, ČR             |
| Kyselina valproová  | Sigma-Aldrich, USA       |
| L-glutamin  | Sigma-Aldrich, USA       |
| L-glycin  | Lach-Ner, ČR             |
| Laktosa   | P-lab, ČR                |
| Leupeptin   | Sigma-Aldrich, USA       |
| IPEI 25 kDa   | Polysciences, USA        |
| Methanol  | P-lab, ČR                |
| N,N'-methylenbisakrylamid   | Serva, USA               |
| Octan sodný   | Sigma-Aldrich, ČR        |
| PCR voda  | Top-Bio, ČR              |
| Pepstatin   | Thermo Fisher, USA       |
| Proteinový standard Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder | Thermo Fisher, USA       |
| Q5 enhancer   | New England Biolabs, USA |
| SDS   | Jersey Lab Supply, USA   |



Síran hořečnatý

TEMED

Tris

Trypanová modř

Trypton

Penta, ČR

Serva, USA

Carl Roth, Německo

Sigma-Aldrich, USA

Duchefa, Nizozemsko

## 4 METODY

### 4.1 PŘÍPRAVA EXPRESNÍHO VEKTORU S GENEM PRO GAL-3-CRD

#### 4.1.1 PCR – AMPLIFIKACE ÚSEKU DNA

Do mikrozkušavky pro polymerázovou řetězovou reakci (*PCR, z angl. polymerase chain reaction*) byl připraven roztok pro PCR smícháním 10  $\mu$ l reakčního pufru a 10  $\mu$ l Q5 enhanceru s 5  $\mu$ l přímého primeru pOPINE\_Gal-3-CRD\_FW, o koncentraci 5  $\mu$ M, 5  $\mu$ l reverzního primeru pOPINE\_Gal-3-CRD\_REV o koncentraci 5  $\mu$ M, 100 ng templátové deoxyribonukleové kyseliny (*DNA, z angl. deoxyribonucleic acid*) a 0,5  $\mu$ l směsi deoxyribonukleosidtrifosfátů (*dNTP, z angl. deoxyribonucleoside triphosphate*) o koncentraci 10mM. Roztok byl poté doplněn na 49,5  $\mu$ l PCR vodou, a nakonec bylo přidáno 0,5  $\mu$ l Q5 DNA polymerasy o koncentraci 1000 U/ml. Následně byla mikrozkušavka se směsí vložena do termocykleru, kde byl nastaven teplotní program. Nejprve byla směs na 5 minut zahřívána při 95 °C, následně proběhlo 30 cyklů: 30 s při 95 °C, 30 s při 67 °C, 1 min při 72 °C. Po třiceti cyklech byla směs ještě 10 min inkubována při 72 °C a následně byla až do vyjmutí z termocykleru udržována teplota 4 °C. Použité podrobnosti o použitých primerech a templátu byly uvedeny v tabulce 2.

**Tabulka 2: Použité primery a templát pro PCR.** Gal-3-WT značí nativní galektin-3 (*Gal-3-WT, z angl. galectin-3 wild type*)

| Přímý primer        | Reverzní primer      | Templátová DNA  | Produkt   |
|---------------------|----------------------|-----------------|-----------|
| pOPINE_Gal-3-CRD_FW | pOPINE_Gal-3-CRD_REV | pOPINE_Gal-3-WT | Gal-3-CRD |

#### 4.1.2 AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA

##### 4.1.2.1 PŘÍPRAVA AGAROSOVÉHO GELU

Byl připravován 0,8% (w/v) agarosový gel v menší a větší variantě. Pro menší variantu bylo přidáno 0,56 g agarosy k 70 ml TAE pufru. V druhém případě bylo přidáno 0,76 g agarosy k 95 ml TAE pufru. Následně byla suspenze zahřívána v mikrovlnné troubě, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarosy. Po vychladnutí přibližně na 50 °C bylo do roztoku přidáno interkalační barvivo Good View II (3  $\mu$ l pro menší variantu gelu a 4,4  $\mu$ l pro větší variantu gelu). Poté byl roztok nalit do připravené aparatury pro agarosovou elektroforézu a byla do něj vložena umělohmotná součástka („hřeben“) pro formování jamek. Po ztuhnutí gelu byl umělohmotný „hřeben“ vyjmut. Ztuhlý agarosový gel byl přelit deionizovanou vodou (*dH<sub>2</sub>O*) a do elektrodových prostorů byl nalit TAE pufr.

#### 4.1.2.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ A PODMÍNKY ELEKTROFORÉZY

K 50  $\mu$ l vzorku DNA bylo přidáno 10  $\mu$ l vzorkového pufru pro agarosovou elektroforézu. Následně bylo do jednotlivých jamek agarosového gelu pipetováno maximálně 30  $\mu$ l vzorku. Do jedné z jamek byl také pipetován DNA standard, a to buď s kratšími úseky DNA v násobcích 100 párů bází (*bp*, z *angl. base pairs*) nebo s delšími úseky DNA s úseky v násobcích 1 kilobáze (*kb*). Poté byly elektrody připojeny k stejnosměrnému zdroji napětí, kde bylo nastaveno napětí 180 V a čas elektroforézy 20 minut. Výsledky byly vizualizovány zobrazovacím zařízením Alliance Q9.

#### 4.1.3 IZOLACE DNA Z AGAROSOVÉHO GELU POMOCÍ KOMERČNÍ SOUPRAVY

Z gelu byla po vizualizaci vyříznuta oblast, kde se nacházel kýžený vzorek. Vyříznutý kus gelu byl poté vložen do mikrozkuhavky a převrstven roztokem „NTI binding buffer“ ze soupravy NucleoSpin Gel and PCR. Následně byla suspenze zahřívána v blokovém termostatu při 55 °C, do úplného rozpuštění agarosového gelu (přibližně 10 min). Roztok byl poté postupně pipetován na kolonku, která byla vložena do mikrozkuhavky. Celý komplet byl poté odstředován při 11000  $\times$  g, 20 °C, po dobu 1 min, nebo dokud nedošlo ke kompletnímu převedení roztoku z kolonky do mikrozkuhavky, ze které byl poté vylit. Na kolonku bylo poté naneseo 700  $\mu$ l promývacího pufru a následně byl celý komplet opět 1 min centrifugován při 11000  $\times$  g a 20 °C, do úplného převedení roztoku z kolonky do mikrozkuhavky. Promytí bylo provedeno dvakrát. Následně byl komplet ještě 2 min centrifugován pro vysušení kolonky při 11000  $\times$  g a teplotě 20 °C. Poté bylo do kolonky naneseo 40  $\mu$ l pufru TAE, který sloužil jako eluční činidlo. Následně byla kolonka vložena do čisté mikrozkuhavky a celý komplet byl centrifugován při 11000  $\times$  g a 20 °C, během čehož došlo k eluci DNA.

#### 4.1.4 ŠTĚPENÍ PLAZMIDU RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEASAMI

Plazmid pOPINE byl štěpen restrikčními endonukleasami NcoI s vysokou přesností (*NcoI-HF*, z *angle NcoI – high fidelity*) a PmeI po dobu 72 hodin při 37 °C v inkubátoru IR 1500. Reakční roztok pro štěpení plazmidu byl připraven v mikrozkuhavce smícháním 5  $\mu$ g plazmidu pOPINE, 2  $\mu$ l komerčního pufru CutSmart, 5 U (0,5  $\mu$ l) enzymu NcoI-HF, 5 U (0,5  $\mu$ l) enzymu PmeI a sterilní dH<sub>2</sub>O, kterou byl roztok doplněn do 20  $\mu$ l. Roztok byl po štěpení analyzován agarosovou elektroforézou (4.1.2) následovanou izolací DNA z agarosového gelu (4.1.3).

#### 4.1.5 TRANSFORMACE PLAZMIDU DO KOMPETENTNÍCH BUNĚK BEZ LIGACE

##### 4.1.5.1 PŘÍPRAVA SMĚSI PRO TRANSFORMACI KOMPETENTNÍCH BUNĚK BEZ LIGACE

V mikrozkuhavce byly smíchány roztoky DNA o celkovém množství 102 ng štěpeného plazmidu pOPINE (4.1.4) s 27 ng amplifikovaného úseku DNA pro Gal-3-CRD (4.1.1). Tato směs byla doplněna na 16  $\mu$ l PCR vodou a byly přidány 4  $\mu$ l komerčního roztoku Ligation-Free Cloning Kit. Vzniklý roztok pro klonování bez ligace (*LFC*, z *angl. ligation-free cloning*) byl poté vložen na 40 min do ledové lázně.

##### 4.1.5.2 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK BEZ LIGACE

Mikrozkuhavka s kompetentními bakteriemi *E. Coli* TOP 10, které byly připraveny Mgr. Ondřejem Skořepou, byla vyjmuta z chladicího boxu Ultra-low UDF-U53V a bakterie byly rozmrazeny v ledové lázni o teplotě 0 °C. Poté bylo 60  $\mu$ l buněčné suspenze pipetováno do připravené směsi pro LFC (4.2.1). Suspenze byla na ledu inkubována 20 min. Následně byla suspenze pod kahanem pipetována na Petriho misku s agarovou plotnou připravenou ze SOB kultivačního média (*SOB*, z *angl. super optimal broth*), která obsahovala přídavek ampicilinu s výslednou koncentrací 100  $\mu$ g/ml a agar o koncentraci 15 g/l. Na agarové plotně byla suspenze rozetřena bakteriologickou kličkou a následně byla Petriho miska přesunuta do inkubátoru IR 1500, kde byla inkubována při 37 °C po dobu 16 hodin.

#### 4.1.6 PCR Z BAKTERIÁLNÍCH KOLONIÍ

Na agarové plotně s ampicilinem byly označeny a očíslovány vybrané bakteriální kolonie (4.1.5.2), ze kterých byly odebrány vzorky špičkami. Do mikrozkuhovek pro PCR byly připraveny roztoky o celkovém objemu 20  $\mu$ l, složené z 10  $\mu$ l komerčního roztoku Combi PPP Master Mix, 2  $\mu$ l přímého primeru pOPINE\_Gal-3-CRD\_FW, o 5  $\mu$ M koncentraci, 2  $\mu$ l reverzního primeru pOPINE\_Gal-3-CRD\_REV, o 5  $\mu$ M koncentraci a 6  $\mu$ l PCR vody. Špičky s odebranými vzorky byly promyty roztokem v jednotlivých mikrozkuhových a poté byly uloženy pro následné použití při nízkoobjemové kultivaci bakterií (4.1.7.1). Směsi v PCR mikrozkuhových byly vloženy do termocyklu. Dle nastaveného teplotního programu byla nejprve směs na 5 min zahřívána při 95 °C, následně proběhlo 20 cyklů: 30 s při 95 °C, 30 s při 67 °C, 1 min při 72 °C. Po 20 cyklech byla směs ještě 10 min inkubována při 72 °C a následně byla až do vyjmutí z termocyklu udržována teplota 4 °C. Poté byla provedena agarosová elektroforéza (4.1.2), z jejichž výsledků byly určeny pozitivní kolonie.

#### 4.1.7 NÍZKOOBJEMOVÁ EXTRAKCE PLAZMIDU POMOCÍ KOMERČNÍ SOUPRAVY

##### 4.1.7.1 NÍZKOOBJEMOVÁ KULTIVACE BAKTERIÍ

Do 50 ml kónické zkumavky bylo pipetováno 5 ml SOB média s přidavkem ampicilinu o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Následně byla také vložena uschovaná špička s pozitivní kolonií *E. coli* TOP 10 (4.1.6) a zkumavka byla umístěna do třepačky, kde byla inkubována při 37 °C a 200 otáčkách za minutu (*RPM, z angl. revolutions per minute*) po dobu 16 hodin.

##### 4.1.7.2 NÍZKOOBJEMOVÁ EXTRAKCE PLAZMIDU POMOCÍ KOMERČNÍ SOUPRAVY

Kónická zkumavka s bakteriemi (4.1.7.1) byla 15 min centrifugována při 3900 × g a 20 °C, načež byl odlit supernatant. K bakteriální peletě byly přidávány roztoky z komerční soupravy NucleoSpin Plasmid, Mini kit. Nejprve bylo přidáno 250 µl pufru „A1“, ve kterém byla peleta resuspendována. Suspenze byla následně pipetována do mikrozukavky, kde bylo k suspenzi přidáno 250 µl pufru „A2“ pro alkalickou lýzi buněk s přidáním acidobazickým indikátorem s modrým zbarvením v alkalickém prostředí. Mikrozukavka byla rukou několikrát jemně protřepána, pro lepší promíchání suspenze a nechána 5 min od stát. Suspenze byla neutralizována přidáním 300 µl pufru „A3“, načež bylo s mikrozukavkou rukou jemně třepáno do úplného odbarvení suspenze. Následně byla mikrozukavka 5 min centrifugována při 11000 – 30000 × g a 20 °C. Po centrifugaci byl supernatant pipetován na kolonku, která byla součástí soupravy. Kolonka byla vložena do mikrozukavky a celý komplet byl 1 min centrifugován při 11000 × g a 20 °C. Roztok, který v důsledku centrifugace protekl do mikrozukavky pod kolonku byl vylit. Kolonka byla následně promyta 500 µl pufru „AW“ a 500 µl pufru „A4“. Po jednotlivých promytích byl opět celý komplet centrifugován po dobu 1 min při 11000 × g a 20 °C. Poté byla kolonka sušena centrifugací při 11000 × g po dobu 2 min při 20 °C. Mikrozukavka pod kolonkou byla vyměněna za čistou a následně byla DNA eluována 50 µl sterilní dH<sub>2</sub>O (sterilizované stříkačkovým mikrofiltrem) přehřáté na blokovém termostatu na 70 °C. Centrifugací za teploty 20 °C při 11000 × g po dobu 1 min došlo k eluci DNA do mikrozukavky.

#### 4.1.8 SEKVENACE DNA

##### 4.1.8.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO SEKVENACI DNA

Pro sekvenaci jednoho úseku DNA byl do dvou mikrozukavek pro PCR pipetován objem roztoku DNA, aby množství DNA odpovídalo 200 ng. Do jedné mikrozukavky byl přidán 1 µl přímého sekvenačního primeru opinEF\_FW, a do druhé zkumavky 1 µl reverzního sekvenačního primeru pTT\_REV. Obě mikrozukavky byly doplněny PCR vodou na celkový objem 8 µl.

#### 4.1.8.2 SEKVENACE DNA

Sekvence izolované DNA (4.1.7.2) byla provedena v Laboratoři sekvenace DNA PĚF UK, paní RNDr. Štěpánkou Hrdou. Na základě výsledků sekvenace byly vybrány vzorky, které neobsahovaly žádné mutace v nukleotidové sekvenci DNA.

#### 4.1.9 VYSOKOOBJEMOVÁ EXTRAKCE PLAZMIDU POMOCÍ KOMERČNÍ SOUPRAVY

##### 4.1.9.1 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK

Mikrozkumavka s kompetentními bakteriemi *E. coli* DH5 $\alpha$ , které byly připraveny Mgr. Ondřejem Skořepou, byla vyjmuta z chladicího boxu Ultra-low UDF-U53V a bakterie byly rozmrazeny v ledové lázni. Následně bylo 50  $\mu$ l buněčné suspenze pipetováno do mikrozkumavky, kam byl poté pipetován 1  $\mu$ g daného plazmidu. Vzniklá směs byla na ledu inkubována 20 min. Poté byla suspenze pod kahanem pipetována na Petriho misku s agarovou plotnou připravenou z kultivačního média LB (*LB*, z *angl. lysogeny broth*) a s přídatkem ampicilinu s výslednou koncentrací 100  $\mu$ g/ml. Na agarové plotně byla suspenze rozetřena bakteriologickou kličkou a následně byla Petriho miska přesunuta do inkubátoru IR 1500, kde byla inkubována při 37 °C po dobu 16 hodin.

##### 4.1.9.2 VYSOKOOBJEMOVÁ KULTIVACE BAKTERIÍ

Z Petriho misky s agarovou plotnou byla vybrána bakteriální kolonie (4.1.9.1), ze které byl špičkou odebrán vzorek, který byl následně i se špičkou vložen do 2l Erlenmayerovy baňky s 500 ml LB média s přídatkem ampicilinu o výsledné koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Erlenmayerova baňka byla následně inkubována při 37 °C na třepačce při 180 RPM po dobu 16 hodin.

##### 4.1.9.3 VYSOKOOBJEMOVÁ EXTRAKCE PLAZMIDU POMOCÍ KOMERČNÍ SOUPRAVY

Buněčná suspenze (4.1.9.2) byla rovnoměrně nalita do dvou 250 ml centrifugačních kyvet, ve kterých byla následně centrifugována při 3900  $\times$  g po dobu 30 min, za teploty 20 °C. Poté byl odlit supernatant a jednotlivé pelety byly resuspendovány, každá v 22,5 ml TES pufru, na vortexovém mixéru. Poté byly obě suspenze přelity do jedné 50 ml kónické zkumavky, která byla následně centrifugována při 3900  $\times$  g po dobu 15 min za teploty 20 °C. Poté byl odlit supernatant a k bakteriím byly přidávány roztoky z komerční soupravy NucleoBond Xtra Maxi. Peleta byla nejprve resuspendována na vortexovém mixéru v 12 ml roztoku „RES buffer“ s přídatkem RNAsy A o výsledné koncentraci 60  $\mu$ g/ml. Poté bylo k suspenzi přidáno 12 ml roztoku k alkalické lýzi buněk s přidáním acidobazickým indikátorem s modrým zbarvením v alkalické oblasti pH. Zkumavka byla rukou několikrát jemně protřepána, pro lepší promíchání suspenze a nechána 5 min odstát. Směs byla poté neutralizována přídatkem 12 ml neutralizačního pufru, kdy bylo se zkumavkou rukou jemně třepáno až do úplného odbarvení suspenze. Poté bylo na kolonu s vloženým papírovým filtrem, jež byla součástí soupravy,

pipetováno 25 ml ekvilibračního pufru, načež bylo vyčkáno do odkapání tohoto roztoku z kolony. Po odkapání roztoku z kolony byl na filtr v koloně nalit buněčný lyzát, kdy byla nerozpustná složka suspenze zachycena filtrem, a opět bylo vyčkáno do odkapání kolony. Retenát byl následně promyt 15 ml ekvilibračního pufru a po odkapání kolony byl filtr vyhozen. Na kolonu bylo poté pipetováno 25 ml promývacího pufru a po odkapání byla DNA eluována 15 ml elučního pufru do centrifugační zkumavky Oak Ridge. K roztoku DNA bylo následně přidáno 10,5 ml izopropanolu zchlazeného na teplotu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , načež byl roztok třepán na vortexovém mixéru. Vzniklá suspenze byla 3 hodiny centrifugována při  $20000 \times g$  při teplotě  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po centrifugaci byla peleta DNA, po odlití supernatantu, resuspendována v 4 ml 70% ethanolu zchlazeného na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , načež byla suspenze opět centrifugována při teplotě  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  a přetížení  $20000 \times g$  po dobu 15 min. Po centrifugaci byl odlit supernatant a bylo vyčkáno do úplného odpaření zbylého ethanolu, načež byla peleta DNA rozpuštěna v 1 ml sterilní  $\text{dH}_2\text{O}$ .

#### 4.1.10 MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA

Koncentrace DNA byla měřena na spektrofotometru DS-11+ při vlnové délce 260 nm. Jako slepý vzorek bylo použito rozpouštědlo, ve které byl měřený vzorek DNA rozpuštěn.

## 4.2 REKOMBINANTNÍ EXPRESE A PURIFIKACE GAL-3-CRD

### 4.2.1 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BAKTERIÍ A PRODUKCE GAL-3-CRD

Nejprve byl kmen T7 kompetentních bakterií *E. coli*, připravených Mgr. Ondřejem Skořepou, vyjmut z chladícího boxu Ultra-low UDF-U53V. Poté byly transformovány plazmidem pOPINE s genem pro Gal-3-CRD (pOPINE\_Gal-3-CRD) (4.1) s postupem analogickým v pododdílu 4.1.9.1. Poté byla provedena nízkoobjemová kultivace T7 *E. coli* bakterií v LB médiu (4.1.7.1), následovaná nalitím 5 ml vzniklé buněčné suspenze do 500 ml LB média s ampicilinem s výslednou koncentrací  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  v 2l Erlenmayerově baňce. Bakterie byly inkubovány při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  na třepačce při 200 RPM a průběžně byla měřena optická denzita při 500 nm ( $OD_{500}$ ), dokud nedosáhla hodnoty mezi 0,4 a 0,6. Měření  $OD_{500}$  bylo prováděno na spektrofotometru Cary 60 UV-Vis. Po dosažení požadované  $OD_{500}$  byla produkce Gal-3-CRD indukována přidáním isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosidu (*IPTG*) do výsledné 1mM koncentrace, načež byla buněčná suspenze inkubována 4 hodiny za výše uvedených podmínek. Následně bylo kultivační médium s bakteriemi rovnoměrně nalito do dvou 250ml centrifugačních kyvet, kde bylo odstředováno po dobu 30 min při  $3900 \times g$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant byl odlit a bakteriální pelety byly jednotlivě resuspendovány v 15 ml TES pufru na vortexovém

mixéru. Následně byly obě suspenze nality do jedné 50ml kónické zkumavky, která byla poté 15 min centrifugována při  $3900 \times g$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , načež byl odlit supernatant.

#### 4.2.2 PURIFIKACE GAL-3-CRD NA LAKTOSOVO-SEPHAROSOVOÉ KOLONĚ

K bakteriální peletě (4.2.1) bylo přidáno 40 ml HEPES pufru, ve kterém byly bakterie resuspendovány. Dále bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  fenylmethylsulfonylfluoridu o 100mM koncentraci, 40  $\mu\text{l}$  leupeptinu o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{l}$  pepstatinu o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{l}$  RNAsy o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$  a 2  $\mu\text{l}$  chloridu hořečnatého o koncentraci 100mM. Následně byly bakterie sonikovány  $3 \times$  po dobu 30 sekund ultrazvukovou sondou při výkonu 20 W. Každá sonikace byla následovaná 60 sekundami chlazení na ledové lázni. Po sonikaci byla kónická zkumavka s buněčným lyzátem centrifugována při  $3900 \times g$  po dobu 20 min, za teploty  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , načež byl odlit supernatant do sterilní lahve, kde byl naředěn přilitím 100 ml pufru HEPES. Peleta byla vyhozena. Zředěný supernatant byl poté zfiltrován do čisté lahve přes filtr o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$ . Filtrát s proteinem byl uchován při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo ihned purifikován. Purifikace Gal-3-CRD byla provedena afinitní chromatografií na Laktosovo-Sepharosovoé koloně připojené k systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie (*HPLC, z angl. high performance liquid chromatography*) ÄKTAbasic. Kolona byla nejdříve ekvilibrována pěti objemy kolony pufrem HEPES. Následně byl na kolonu pumpován zředěný supernatant s Gal-3-CRD průtokem 5 ml/min. Zadržovaný protein byl z kolony izokraticky uvolněn elučním pufrem pro Laktosovo-Sepharosovou kolonu, kdy byl protein jímán do 15ml kónických zkumavek. Kolona byla poté promyta 30 ml pufru HEPES a 30 ml 20% ethanolu.

#### 4.2.3 DIALÝZA GAL-3-CRD

Pro dialýzu byla používána dialyzační kazeta, kam byl pipetován roztok Gal-3-CRD, který byl naředěn HEPES pufrem na celkový objem 10 ml. Dialyzační kazeta byla poté vložena do kádinky s 1,5 l HEPES pufru, proti kterému byl roztok Gal-3-CRD dialyzován po dobu 90 minut, za stálého míchání magnetickým míchadlem. Následně byl dialyzační roztok vyměněn a dialýza byla provedena znovu. Nakonec byla dialyzační kazeta přesunuta do kádinky s 2 l HEPES pufru, kde byl protein dialyzován za teploty  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , za stálého míchání magnetickým míchadlem po dobu 12 hodin.



### 4.3 REKOMBINANTNÍ EXPRESE PROTEINŮ V SAVČÍCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH HEK293S GNTI<sup>-</sup> A HEK293T

Ligand vázající doména receptoru NKp30 (*NKp30-LBD*) a receptor NKp30 se „stalk“ doménou (*NKp30-Stalk*) byly produkovány ve dvou variantách. První varianta byla exprimována v suspenzní lidské embryonální ledvinné linii 293, bez aktivity N-acetyl-glukosaminyltransferasy I (*HEK293S GnTI<sup>-</sup>*, z angl. *human embryonic kidney 293 suspension culture, N-acetyl-glucosaminyltransferase I*). Tato buněčná linie poskytovala uniformní N-glykosylaci manosového typu LBD receptoru NKp30 (*LBD S*) a NKp30 se „stalk“ doménou (NKp30 Stalk S). Druhá varianta byla exprimována v lidské embryonální ledvinné linii 293, exprimující mutovanou variantu velkého T antigenu SV40 (*HEK293T*, z angl. *human embryonic kidney 293, expressing a mutant version of the SV40 large T antigen*), která byla ovšem také přizpůsobena pro suspenzní kultivaci. Expres v této buněčné linii poskytovala komplexní přirozenou N-glykosylaci LBD receptoru NKp30 (*LBD T*) a NKp30 se „stalk“ doménou (NKp30 Stalk T).

#### 4.3.1 URČOVÁNÍ KONCENTRACE BUNĚK

Vzorek buněčné suspenze o objemu 20 µl byl pipetován do mikrozkušavky, kde byl naředěn 2× až 9× roztokem trypanové modři. Následně byla obarvená suspenze pipetována do hemocytometru, který byl umístěn pod mikroskop, načež bylo spočítáno množství živých buněk. Celkové množství buněk bylo pak získáno vynásobením spočítaného množství buněk ředícím a objemovým faktorem, čímž bylo získáno množství buněk v 1 ml kultivačního média. Viabilita buněk byla určována jako stonásobek poměru živých buněk a celkového množství buněk.

#### 4.3.2 REKOMBINANTNÍ EXPRESE NKp30-LBD STABILNĚ TRANSFEKOVANÝMI BUNĚČNÝMI LINIEMI HEK293S GNTI<sup>-</sup> A HEK293T

N-glykosylační varianty NKp30-LBD byly produkovány stabilně transfekovanými lidskými buněčnými liniemi HEK293S GNTI<sup>-</sup> a HEK293T (4.3). Tyto linie využívající systém piggyBac byly připraveny Mgr. Ondřejem Skořepou [50,51]. Exprimované proteiny byly sekretovány do kultivačního média. Pro produkci obou N-glykosylačních variant byl použit analogický postup. Buňky byly kultivovány v čtverhranných lahvích s prodyšnými víčky v 400 ml média ExCell293, do něž byl přidán L-glutamin s výslednou 4mM koncentrací. Kultivace buněk probíhala na třepačce v 5% atmosféře CO<sub>2</sub>, při teplotě 37 °C a 135 RPM, do výsledné koncentrace 2 × 10<sup>6</sup> buněk/ml (4.3.1). Po dosažení této koncentrace byla exprese v obou případech indukována přídatkem doxycyklinu do výsledné koncentrace 1 µg/ml. Produkce probíhala 5 dní.

#### 4.3.3 REKOMBINANTNÍ EXPRESE NKp30-STALK BUNĚČNÝMI LINIEMI HEK293S GnTI<sup>-</sup> A HEK293T METODOU VYSOKOHUSTOTNÍ TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE

N-Glykosylační varianty NKp30-Stalk byly produkovány buněčnými liniemi HEK293S GnTI<sup>-</sup> a HEK293T (4.3) metodou vysokohustotní tranzientní transfekce. Buněčné suspenze obou buněčných linií byly připraveny v objemu 300 ml Mgr. Barborou Kalouskovou. Buněčné linie byly kultivovány v médiu ExCell293. V případě linie HEK293T kultivace probíhala do koncentrace  $5 \times 10^6$  –  $10 \times 10^6$  buněk/ml a v případě linie HEK293S GnTI<sup>-</sup> do koncentrace  $5 \times 10^6$  buněk/ml (4.3.1). Následně byly buňky v obou případech centrifugovány při 20 °C po dobu 5 min při  $90 \times g$ , načež byl odlit supernatant. Vysokohustotní tranzientní transfekce u obou buněčných linií byla poté prováděna resuspendováním pelety ve 32 ml kultivačního média ExCell293, načež bylo k suspenzi přidáno 8 ml pufru PBS-TK s rozpuštěnými plazmidy. Výsledná koncentrace buněk dosahovala  $20 \times 10^6$  buněk/ml. Plazmidy byly v obou případech přidávány v následujícím hmotnostním procentuálním zastoupení: 88 % produkčního plazmidu pTW5sec\_NKp30\_Stalk, 2 % pTW5-aFGF a 10 % pTW5-p27. Celková hmotnost přidávané DNA činila 800 ng. Poté byl k suspenzi přidáván lineární polyethylenimin (IPEI). V případě HEK293T byl IPEI přidáván v poměru hmotností DNA a IPEI 1:4, ve prospěch IPEI a v případě HEK293S GnTI<sup>-</sup> 1:3, ve prospěch IPEI. Suspenze byla poté třepána při 135 RPM, 37 °C, v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> po dobu 90 min. Poté byla suspenze doplněna na celkový objem 400 ml kultivačním médiem ExCell293 a byla přidána kyselina valproová s výslednou koncentrací 2 mM, penicilin s výslednou koncentrací 10 U/ml a streptomycin s výslednou koncentrací 1 µg/ml. Produkce probíhala 5 dní.

#### 4.3.4 SKLÍZENÍ BUNĚK

Buněčná suspenze byla přelita do sterilních 85 ml centrifugačních kyvet, ve kterých byla odstředována po dobu 30 min při 4 °C a  $15000 \times g$ . Supernatant s proteinem byl poté přefiltrován do čisté lahve přes filtr o velikosti pórů 0,22 µm. Filtrát s proteinem byl uchován při -20 °C nebo ihned purifikován.

#### 4.3.5 PURIFIKACE PROTEINŮ S HISTIDINOVOU KOTVOU

Proteiny zmiňované v oddíle 4.3 byly produkovány s histidinovou kotvou na C-konci proteinu.

##### 4.3.5.1 CHELATAČNÍ CHROMATOGRAFIE

Proteiny s histidinovou kotvou byly purifikovány kolonkou Talon HiTrap 5 ml, za kterou následovala odsolovací kolona HiPrep 26/10 Desalting. Obě kolony byly připojeny na HPLC systém ÄKTAbasic. Kolony byly nejprve promyty 250 ml pufru HEPES, při průtoku 5 ml/min. Zfiltrované kultivační médium s proteinem bylo

2 × naředěno pufrém HEPES. Následně bylo naředěné médium nanášeno na kolonky průtokem 5 ml/min, načež byly kolony promyty pufrém HEPES, do ustálení absorbance při 280 nm na původní hodnotu. Zachycený protein byl z kolonky uvolněn izokraticky, elučním pufrém pro Talon, přičemž byl daný protein jímán do 15ml kónických zkumavek, za stálého měření vodivosti a absorbance při 280 nm. Kolony byly poté promyty sérií roztoků, vždy 70 ml v následujícím pořadí: octanový pufr, PBS pufr, deionizovaná voda. Kolonka byla následně převedena do 20% ethanolu. Kolonka byla uchováána při 4 °C.

#### 4.3.5.2 ZKONCENTROVÁNÍ PROTEINŮ

Pro zkoncentrování proteinů byl používán koncentrátor Amicon Ultra – MWCO 10000, který zachytí proteiny s molekulovou hmotností vyšší, než 10 kDa. Roztok proteinu byl pipetován do horní části koncentrátoru, načež byl několikanásobně centrifugován při 4 °C, 3900 × g, po dobu 5 minut. Mezi jednotlivými centrifugacemi byl vzorek pipetou promíchán a doplňován. Centrifugace byly ukončeny, když se objem vzorku snížil na přibližně 300 µl. Následně byl vzorek z koncentrátoru pipetován do mikrozkuavky a koncentrátor byl promyt pufrém HEPES, deionizovanou vodou a následně byl uschován při 4 °C naplněný pufrém HEPES.

#### 4.3.5.3 PREPARATIVNÍ GPC

Preparativní gelová permeační chromatografie (*GPC*) byla prováděna na koloně Superdex 200 10/300 GL, která byla připojena k HPLC systému ÄKTAbasic. Kolona byla nejprve ekvilibrována 30 ml mobilní fáze, tedy pufrém HEPES, při průtoku 0,75 ml/min. Následně byla pufrém HEPES promyta i nástřiková smyčka, a to pěti jejími objemy. Na kolonu byl nanášen vzorek proteinu o maximálním objemu 400 µl. Průběh chromatografie, která byla prováděna izokraticky při průtoku 0,75 ml/min, byl sledován absorbančním detektorem, který měřil absorbanci při 280 nm a vodivostním detektorem. Jednotlivé frakce byly automatickým sběračem frakcí jímány do mikrozkuavek. Následně byla kolona promyta 30 ml pufru HEPES, 30 ml dH<sub>2</sub>O, 30 ml 0,1M hydroxidu sodného a nakonec byla převedena do 20% ethanolu, v němž byla dlouhodobě uchováána.

### 4.4 CHARAKTERIZACE PROTEINŮ

#### 4.4.1 MĚŘENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

Koncentrace proteinů byla měřena na spektrofotometru DS-11+ při vlnové délce 280 nm. Do programu spektrofotometru byl zadán molární extinkční koeficient proteinu predikovaný z jeho aminokyselinové sekvence a jeho relativní molekulová hmotnost. Jako slepý vzorek byl použit pufr, ve kterém byl daný protein uchován.

#### 4.4.2 SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsíranu sodného (*SDS-PAGE*, z *angl. sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*) byla prováděna za účelem ověření čistoty finálních roztoků proteinů. Byly připravovány dva 12,5% polyakrylamidové gely, přičemž horní byl zaostřovací a spodní byl rozdělovací. Elektroforetická skla byla umístěna do držáku pro přípravu SDS-PAGE. Nejprve byl připravován rozdělovací gel, a to smícháním 1,265 ml dH<sub>2</sub>O, 1,675 ml roztoku AA pro SDS-PAGE, 1 ml 1,5M Tris pH 8,8, 40 µl 10% dodecylsíranu sodného (*SDS*, z *angl. sodium dodecyl sulfate*) a 2 µl tetramethylethylendiaminu (*TEMED*). Polymerizace byla nakonec iniciována přidáním 40 µl peroxidisíranu amonného (*APS*, z *angl. ammonium persulfate*). Tekutý roztok byl poté rychle pipetován mezi elektroforetická skla, načež byl převrstven vodou.

Poté byl připravován zaostřovací gel, a to smícháním 0,7 ml dH<sub>2</sub>O, 0,25 ml roztoku AA pro SDS-PAGE, 0,125 ml 1M Tris pH 6,8, 10 µl 10% SDS, 1,5 µl TEMED a polymerizace byla iniciována přidáním 10 µl APS. Voda nad ztuhlým rozdělovacím gelem byla odlita a mezi elektroforetická skla byl pipetován tekutý roztok zaostřovacího gelu, do nějž byl poté vložen plastový „hřeben“, který tvořil jamky pro vzorek. Po ztuhnutí byl „hřeben“ vyjmut a elektroforetická skla byla umístěna do aparatury pro elektroforézu, která byla naplněna elektrodoým pufrem. Následně byl i gel převrstven elektrodoým pufrem.

Vzorky proteinů pro SDS-PAGE, o maximálním objemu 10 µl, byly pipetovány do mikrozkuavek a byly připravovány v duplikátech. První vzorek byl smísen s 5 × koncentrovaným redukcujícím vzorkovým pufrem. Druhý vzorek byl smísen s 5 × koncentrovaným nereducujícím vzorkovým pufrem. Vzorky byly poté na 5 min umístěny do blokového termostatu, kde byly inkubovány při 95 °C, načež byly centrifugovány při 10000 × g, po dobu 1 min, při 20 °C. Následně byly pipetovány do jamek gelu. Do jedné z jamek byl také pipetován proteinový standard. Elektroforéza probíhala 45–60 min, při stejnosměrném napětí 200 V.

Po elektroforéze byl gel opatrně vyjmut z elektrodoých skel, načež byl přesunut do barvicího roztoku pro SDS-PAGE, kde byl barven minimálně 30 min, za míchání na třepačce při 60 RPM. Poté byl přesunut do odbarvovacího roztoku pro SDS-PAGE, kde byl v minimálně třech krocích odbarvován po dobu 45 min, za stálého míchání na třepačce při 60 RPM. Fotografie gelu byla pořízena zobrazovacím zařízením Alliance Q9.

#### 4.4.3 DEGLYKOSYLACE PROTEINŮ

Deglykosylována byla část proteinů, které byly produkovány v buněčné linii HEK293S GnTI. Každý z proteinů byl deglykosylován ve dvou variantách. První variantou byla deglykosylace při 4 °C, s poměrem proteinu ku endoglykosidáze 20:1. Druhou variantou byla deglykosylace při 37 °C, s poměrem proteinu ku endoglykosidáze 100:1. K deglykosylaci byla používána Endoglykosidasa F1 ve fúzi s glutathion-S-transferasou (EndoF1-GST), jež byla rekombinantně připraven Mgr. Ondřejem Skořepou. Glutathion-S-transferasa představovala afinitní kotvu pro pozdější repurifikaci.

Nejprve byly do mikrozkušavek naředěny vzorky proteinů, aby jejich koncentrace dosahovala maximálně 1 mg/ml. Poté byla k vzorku proteinu přidávána endoglykosidáza ve výše uvedených poměrech. Pro obě uvedené teploty probíhala deglykosylace 16 hodin. Následně byl vzorek centrifugován po dobu 15 minut při 20 °C a 20000 × g, načež byl supernatant přes HPLC systém ÄKTA basic nastříknut na předem ekvilibrovanou 30 ml HEPES pufru GSTrapFF 5 ml kolonku, kdy došlo k zachycení EndoF1-GST, zatímco deglykosylovaný protein zachycen nebyl. Repurifikace probíhala při průtoku 0,5 ml/min, přičemž byl jako mobilní fáze použit pufr HEPES. Po celou dobu byla detektorem měřena absorbance při 280 nm. Následně byl z kolonky zachycený EndoF1-GST eluován 40 ml 10mM roztoku redukovaného glutathionu. Kolonka byla poté promyta 30 ml HEPES pufru a převedena do 20% ethanolu, ve kterém byla uchovávána.

#### 4.4.4 ANALYTICKÁ GPC

Analytická GPC byla prováděna analogicky s preparativní GPC (4.3.5.3). Rozdíl byl však v druhu použité kolony. V případě analytická GPC byla používána kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL, či Superdex 75 Increase 10/300 GL. Dalším rozdílem bylo, že při analytické GPC nebyly jímány žádné frakce.

Pro charakterizaci interakce proteinů pomocí analytické GPC byly vzorky dvou proteinů připravovány v molárních poměrech 1:1, v maximálním objemu 300 µl.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 SEKVENCE EXPRIMOVANÝCH PROTEINŮ

#### 5.1.1 SEKVENCE GAL-3-CRD

Prvním cílem práce bylo připravit gen, který kóduje pouze CRD galektinu-3. Jako předloha sloužil plazmid nesoucí Gal-3-WT. Gen pro Gal-3-CRD, který byl určen pro expresi v *E. coli* T7, byl amplifikován pomocí PCR z plazmidu pOPINE\_Gal-3-WT, který byl připraven Mgr. Ondřejem Skořepou a nesl gen pro Gal-3-WT. Aminokyselinová sekvence obou proteinů je uvedena na obrázku 7.

#### Gal-3-WT

MADNFSLHDALESGSGNPNPQGWPGA WGNQPAGAGGYPGASYPGAYPGQAPP  
GAYPGQAPPGAYPGAPGAYPGAPAPGVYPPGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYPAT  
GPYGAPAGPLIVPYNLPLPGGVVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFH  
FNPRFNENNRVIVCNTKLDNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVA  
VND AHL LQYNHRVKKLNEISKLGISGDIDLTSASYTMI

#### Gal-3-CRD

PLIVPYNLPLPGGVVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNEN  
NRVIVCNTKLDNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVND AHL LQ  
YNHRVKKLNEISKLGISGDIDLTSASYTMI

#### Obrázek 7: Aminokyselinové sekvence Gal-3-WT a Gal-3-CRD

Zelenou barvou je vyznačena aminokyselinová sekvence Gal-3-CRD. Červeně jsou vyznačena fosforylační místa a žlutou barvou cysteiny.

#### 5.1.2 SEKVENCE NKp30-STALK A NKp30-LBD

Receptor NKp30 byl v lidských buněčných liniích exprimován ve dvou strukturních variantách, a to jako NKp30-Stalk a NKp30-LBD. Aminokyselinové sekvence obou proteinů jsou uvedeny na obrázku 8.

#### NKp30-Stalk

ITGLWVSQPPEIRTLEGSSAFLPCSFNASQGR LAIGSVTWFRDEVVPGKEVRNGT  
PEFRGRLAPLASSRFLHDHQAELHIRDVRGHDASIYVCRVEVLGLGVGTGNGTR  
LVVEKEHPQLGAGTVLLLRGTHHHHHHHHG

#### NKp30-LBD

ITGLWVSQPPEIRTLEGSSAFLPCSFNASQGR LAIGSVTWFRDEVVPGKEVRNGT  
PEFRGRLAPLASSRFLHDHQAELHIRDVRGHDASIYVCRVEVLGLGVGTGNGTR  
LVVEKEGTHHHHHHHHG

#### Obrázek 8: Aminokyselinové sekvence NKp30-Stalk a NKp30-LBD

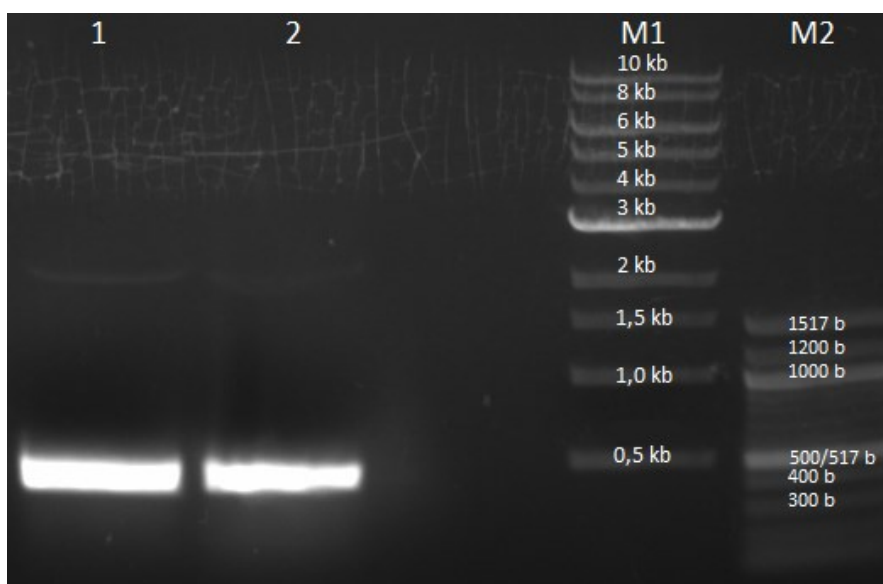
Modrou barvou je vyznačena aminokyselinová sekvence NKp30-LBD. Podtržené aminokyseliny v sekvenci NKp30-Stalk značí „stalk“ doménu, přičemž červenou barvou je vyznačen arginin zodpovědný za interakci s adaptorovou molekulou CD3ζ. Fialově je vyznačena N-glykosylační místa a žlutě jsou vyznačeny cysteiny.

## 5.2 PŘÍPRAVA PLAZMIDU POPINE\_GAL-3-CRD

Pro rekombinantní expresi Gal-3-CRD bylo třeba do linearizovaného expresního vektoru pOPINE vložit gen pro Gal-3-CRD. Gen byl amplifikován pomocí PCR (Obrázek 9) z expresního vektoru obsahujícího Gal-3-WT.

### 5.2.1 PŘÍPRAVA GENU PRO GAL-3-CRD

Nejprve byl gen pro Gal-3-CRD, s délkou 447 bp, amplifikován pomocí PCR z plazmidu pOPINE\_Gal-3-WT, nesoucího gen pro Gal-3-WT, za použití přímého primeru pOPINE\_Gal-3-CRD\_FW a reverzního primeru pOPINE\_Gal-3-CRD\_REV. Poté byla provedena agarosová elektroforéza, kdy byly detekovány pruhy DNA odpovídající velikosti přibližně 400 bp (Obrázek 9). Z agarosového gelu byla následně DNA extrahována.

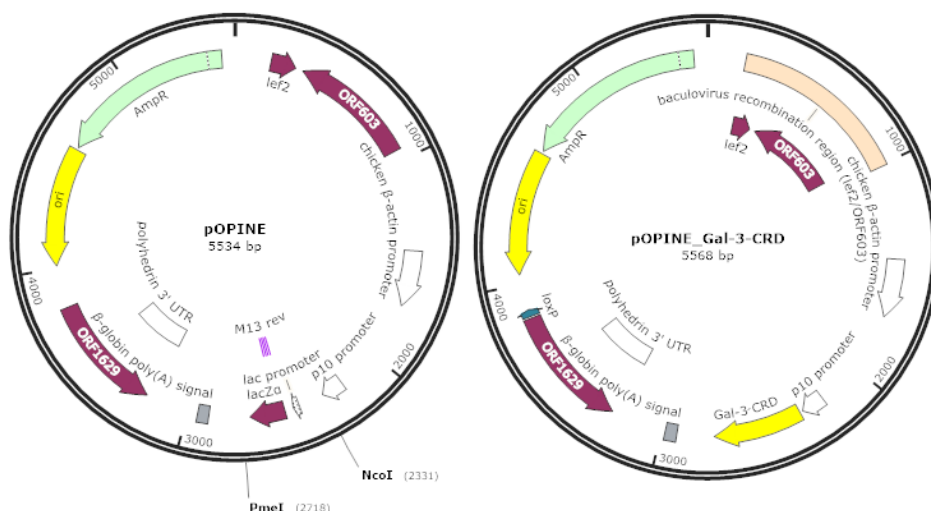


### Obrázek 9: Výsledky agarosové elektroforézy po PCR k amplifikaci genu pro Gal-3-CRD

Jamky označené číslicemi 1 a 2 obsahovaly vzorky amplifikovaného genu pro Gal-3-CRD. Jamka označená jako M1 (*marker*) obsahovala 1 kb DNA standard a jamka M2 obsahovala 100 bp DNA standard. Je patrné, že byl gen úspěšně amplifikován, protože poloha pruhů odpovídá předpokládané velikosti 447 bp.

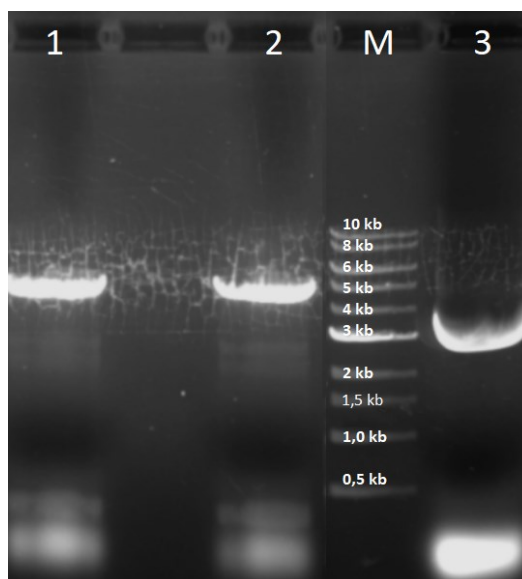
### 5.2.2 LINEARIZACE PLAZMIDU POPINE

Z plazmidu pOPINE byl restričními endonukleasami NcoI-HF a PmeI vyštěpen úsek o 387 bp, který nesl lac promotor a gen pro peptid lacZ $\alpha$  (Obrázek 10, str. 48). Poté byla provedena agarosová elektroforéza (Obrázek 11, str. 48), následovaná extrakcí linearizovaného plazmidu z agarosového gelu.



**Obrázek 10: Mapa expresních vektorů pOPINE a pOPINE\_Gal-3-CRD**

Vlevo je mapa expresního vektoru pOPINE, nesoucího gen pro rezistenci na ampicilin, který byl schematicky zobrazen zelenou šipkou. Tento gen sloužil jako selekční marker. Z tohoto expresního vektoru byl vyštěpen vyznačený úsek, nesoucí lac promotor a gen pro lacZ $\alpha$ , a to pomocí restrikčních endonukleas NcoI-HF a PmeI. Do tohoto úseku byl vložen gen pro Gal-3-CRD. Vpravo je mapa expresního vektoru s vloženým genem pro Gal-3-CRD, která je v dolní části znázorněn žlutou šipkou, kde nebyly zachovány sekvence pro štěpení restrikčními endonukleasami NcoI a PmeI.

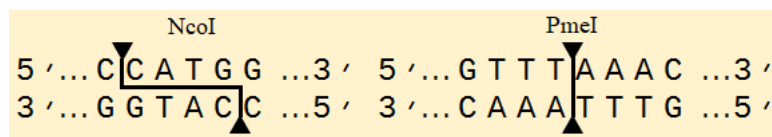


**Obrázek 11: Výsledky agarosové elektroforézy linearizovaného plazmidu pOPINE**

Jamky označené číslicemi 1 a 2 obsahovaly vzorky linearizovaného plazmidu, kde je v dolních částech jejich drah patrný vyštěpený úsek DNA o délce 387 bp. Do jamky označené písmenem M byl pipetován 1 kb DNA standard. Do jamky označené číslicí 3 se jako kontrolní vzorek nacházel neštěpený plazmid pOPINE.

Obě restrikční endonukleasy štěpí DNA v palindromických sekvencích, přičemž NcoI-HF zanechává čtyřnukleotidové přesahy na obou vláknkách, zatímco PmeI štěpí DNA bez přesahů (Obrázek 12, str. 49).



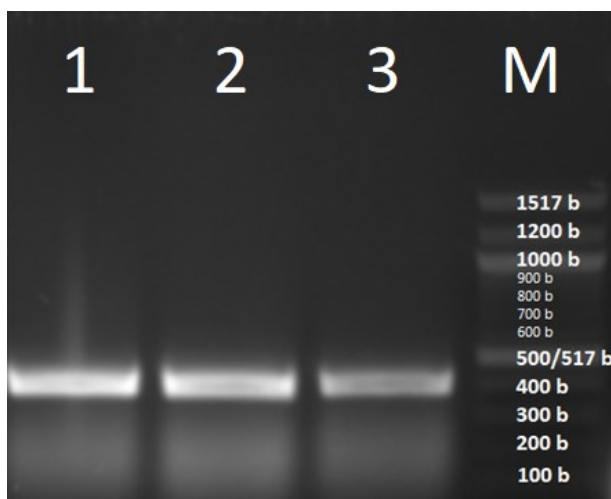


**Obrázek 12: Schéma stěpení DNA restrikčními endonukleasami NcoI a PmeI**

Vlevo je zobrazena palindromická sekvence, kde štěpí restrikční endonukleasa NcoI, přičemž zanechává čtyřnukleotidové přesahy na obou vlákních DNA. Vpravo je zobrazena palindromická sekvence, kde štěpí restrikční endonukleasa PmeI, která nezanechává žádné přesahy.

### 5.2.3 LFC A PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLAZMIDU POPINE\_GAL-3-CRD

Gen pro Gal-3-CRD byl metodou LFC nekovalentně vložen do štěpeného plazmidu pOPINE (Obrázek 10, str. 48), načež byl reakční směsí pro LFC transformován kmen TOP 10 bakterie *E. coli*, načež byla provedena PCR s vzniklými bakteriálními koloniemi. Při PCR s bakteriálními koloniemi byl použit přímý primer pOPINE\_Gal-3-CRD\_FW a reverzní primer pOPINE\_Gal-3-CRD\_REV. Poté byla provedena agarosová elektroforéza (Obrázek 13), kdy byl po vizualizaci výsledků identifikován pruh DNA o přibližné délce 400 bp. Poté byla provedena nízkoobjemová kultivace bakterií následovaná nízkoobjemovou extrakcí plazmidu pomocí komerční soupravy. Následně byla provedena sekvenace extrahovaných vzorků získaného plazmidu pOPINE\_Gal-3-CRD v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK, paní RNDr. Štěpánkou Hrdou. Veškeré vzorky, které byly odeslány k sekvenaci, měly shodnou nukleotidovou sekvenci se sekvencí genu pro Gal-3-CRD.



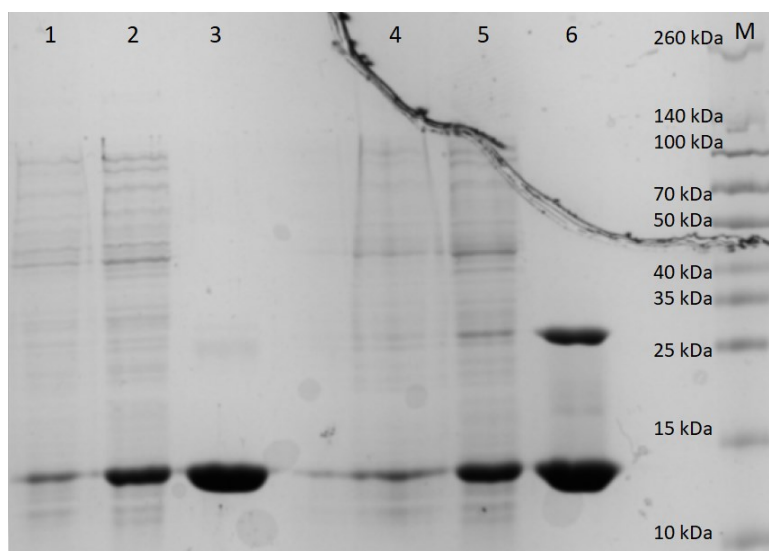
**Obrázek 13: Výsledky agarosové elektroforézy genu pro Gal-3-CRD po PCR z bakteriálních kolonií**

V jamkách 1, 2 a 3 se nacházely vzorky genu pro Gal-3-CRD, který byl amplifikován pomocí PCR ze třech vybraných bakteriálních kolonií. Do jamky označené písmenem M byl pipetován 100 bp DNA standard. Je patrné, že vzorky obsahovaly DNA o předpokládané velikosti, která byla 447 bp.

Poté byly takto připraveným plazmidem pOPINE\_Gal-3-CRD transformovány bakterie *E. coli* DH5 $\alpha$ , načež byla provedena vysokoobjemová kultivace bakterií následovaná vysokoobjemovou extrakcí plazmidu pomocí komerční soupravy. Tím bylo připraveno finální zásobní množství plazmidu pOPINE\_Gal-3-CRD.

### 5.3 REKOMBINANTNÍ EXPRESE A PURIFIKACE GAL-3-CRD

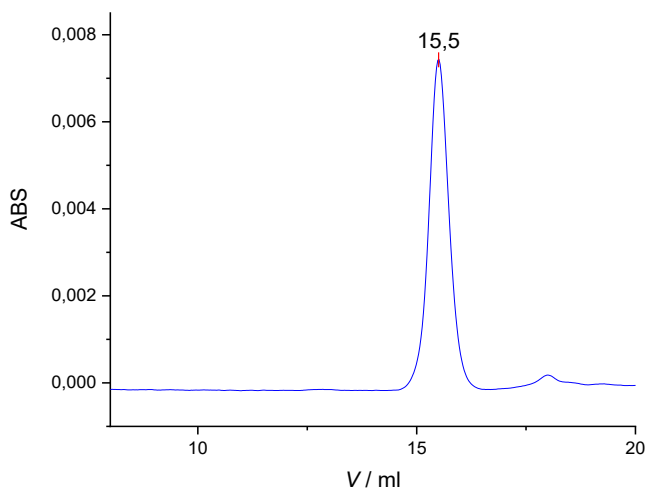
Pro produkci Gal-3-CRD byly transformovány bakterie *E. coli* T7 plazmidem pOPINE\_Gal-3-CRD (5.2). Poté byla provedena nízkoobjemová kultivace bakterií, na kterou navazovala vysokoobjemová kultivace bakterií, během které byla exprese Gal-3-CRD indukována přidavkem IPTG. Po inkubaci pro produkci Gal-3-CRD, následovanou odstředěním suspenze a sonikací byl protein purifikován na Laktosovo-Sepharosové koloně, načež byla provedena SDS-PAGE, kde byla v neredukujícím prostředí identifikována částečná dimerizace Gal-3-CRD, zatímco v redukujícím prostředí identifikována nebyla (Obrázek 14). Na obrázku 14 je rovněž patrná vysoká čistota purifikovaného proteinu o molekulové hmotnosti přibližně 15,9 kDa. Výtěžek Gal-3-CRD činil 4 mg na litr buněčné suspenze.



**Obrázek 14: Analýza purifikace proteinu Gal-3-CRD pomocí SDS-PAGE**

V jamce s označením M se nacházel proteinový standard. V první trojici jamek označených číslicemi 1, 2 a 3 se nacházely vzorky v redukujícím vzorkovém pufru pro SDS-PAGE, zatímco v druhé trojici jamek – 4, 5 a 6 se nacházely vzorky v neredukujícím vzorkovém pufru pro SDS-PAGE. V jamkách číslo 1 a 4 se nacházel resuspendovaný vzorek bakteriální pelety po sonikaci. V jamkách číslo 2 a 5 se nacházel vzorek nepurifikovaného supernatantu po sonikaci bakteriální pelety a její následné centrifugaci, kde je v neredukujícím prostředí rovněž identifikovatelná částečná dimerizace proteinu. V jamkách číslo 3 a 6 se nacházel vzorek purifikovaného Gal-3-CRD přes Laktosovo-Sepharosovou kolonu, kde je viditelné, že v neredukujícím prostředí (jamka 6) dochází k částečné dimerizaci Gal-3-CRD, zatímco v redukujícím prostředí (jamka 3) je protein monomerní. Předpokládaná molekulová hmotnost Gal-3-CRD je 15,9 kDa.

Následně byla provedena analytická GPC, za použití kolony Superdex 75 Increase 10/300 GL, za účelem ověření dimerizace Gal-3-CRD v neredukujícím prostředí. Oproti SDS-PAGE výsledek analytické GPC po porovnání se známou komerční kalibrací kolony naznačuje, že se protein nachází v roztoku jako monomer (Obrázek 15).



**Obrázek 15: Chromatogram analytické GPC Gal-3-CRD**

Chromatogram analytické GPC purifikovaného Gal-3-CRD, za použití kolony Superdex 75 Increase 10/300 GL. Graf ukazuje závislost absorpce při 280 nm (*ABS*) na objemu (*V*). Eluční objem Gal-3-CRD byl 15,5 ml.

#### 5.4 REKOMBINANTNÍ EXPRESE A PURIFIKACE NKp30-LBD A NKp30-STALK BUNĚČNÝMI LINIEMI HEK293S GNTI<sup>-</sup> A HEK293T

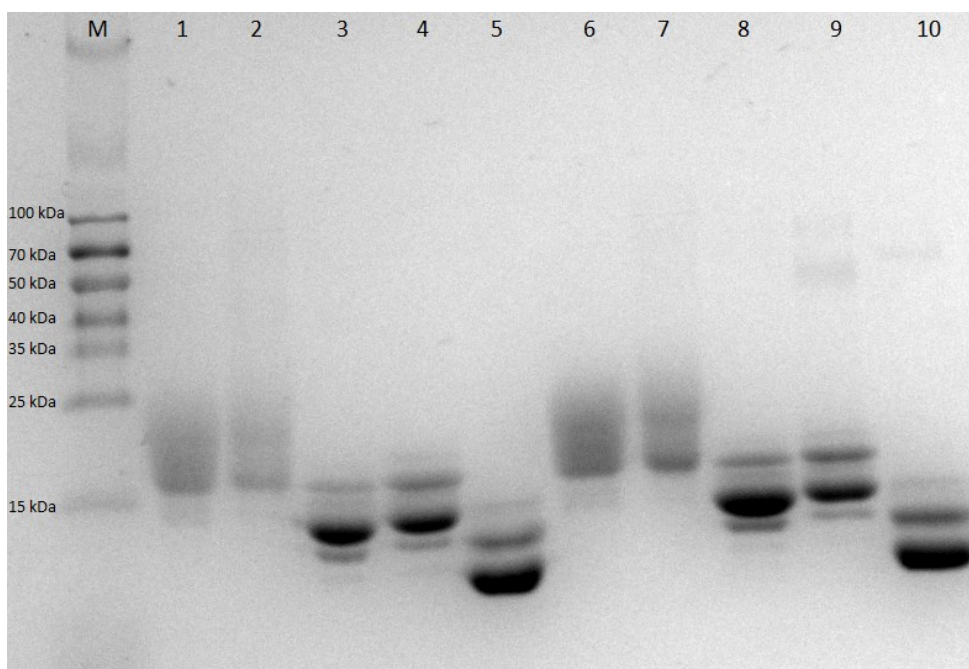
Shrnutí produkce jednotlivých variant receptoru NKp30 a jejich specifikací bylo uvedeno v tabulce 3.

**Tabulka 3: Shrnutí specifikací produkcí jednotlivých variant receptoru NKp30.** Buněčné linie byly připraveny Mgr. Ondřejem Skořepou. K tranzientní transfekci byl jako produkční plazmid použit pTW5sec\_NKp30\_Stalk. Zkratka LBD D značí deglykosylovanou formu ligand vázající domény receptoru NKp30 a NKp30 Stalk D značí deglykosylovanou formu receptoru NKp30 se „stalk“ doménou.

| Způsob produkce                           | Protein       | Glykosylace                        | Stabilní/tranzientní transfekce |
|---|---------------|------------------------------------|---------------------------------|
| V buněčné linii HEK293S GNTI <sup>-</sup> | LBD S         | Uniformní                          | Stabilní                        |
|   | NKp30 Stalk S | Uniformní                          | Tranzientní                     |
| V buněčné linii HEK293T                   | LBD T         | Komplexní                          | Stabilní                        |
|   | NKp30 Stalk T | Komplexní                          | Tranzientní                     |
| Deglykosylací EndoF1-GST                  | LBD D         | Jedno reziduum N-acetylglukosaminu | -                               |
|   | NKp30 Stalk D | Jedno reziduum N-acetylglukosaminu | -                               |

Proteiny produkované v obou buněčných liniích byly sekretovány do kultivačního média. Buněčné linie stabilně transfekované genem pro NKp30-LBD [(LBD S, LBD T), Tabulka 3, str. 51] využívaly systém piggyBac [50,51].

Po expresi jednotlivých proteinů byly ve všech případech buňky sklizeny. Následně byly jednotlivé proteiny obsažené v jednotlivých kultivačních médiích (LBD S, NKp30 Stalk S, LBD T, NKp30 Stalk T) purifikovány chelatační chromatografií na kolonce HiTrap Talon Crude 5 ml a odsoleny kolonou HiPrep 26/10 Desalting. Následně byly jednotlivé proteiny zkoncentrovány a přečištěny preparativní GPC, za použití kolony Superdex 200 10/300 GL. Pomocí preparativní GPC nebyl přečišťován pouze NKp30 Stalk T. Jako kontrola kvality byla poté pro všechny proteiny provedena SDS-PAGE (Obrázek 16). Předpokládaná molekulová hmotnost LBD S a LBD T činila přibližně 17,5 kDa. Předpokládaná molekulová hmotnost LBD D činila přibližně 13,9 kDa. Předpokládaná molekulová hmotnost NKp30 Stalk S a NKp30 Stalk T činila přibližně 18,9 kDa. V některých případech molekulová hmotnost proteinů pozorovaná pomocí SDS-PAGE neodpovídala hmotnostem proteinového standardu, pravděpodobně v důsledku abnormální mobility glykoproteinů.



**Obrázek 16: Analýza purifikace variant receptoru NKp30 pomocí SDS-PAGE**

V jamkách 1 – 5 se nacházely vzorky v neredukujícím prostředí a v jamkách 6 – 10 se nacházely vzorky v redukujícím prostředí. Do jamky označené písmenem M byl pipetován proteinový standard. V jamkách 1 a 6 se nacházely vzorky LBD T a v jamkách 2 a 7 se nacházely vzorky NKp30 Stalk T. Pruhy těchto vzorků jsou značně rozmazány, kvůli komplexní N-glykosylaci těchto proteinů. V jamkách 3 a 8 se nacházely vzorky LBD S a v jamkách 4 a 9 se nacházely vzorky NKp30 Stalk S. V jamkách 5 a 10 se nacházely vzorky LBD D, kde je patrné, že vzorky obsahují zbytkové množství N-glykosylovaného LBD S. Předpokládaná molekulová hmotnost LBD S a LBD T činila přibližně 17,5 kDa, LBD D je přibližně 13,9 kDa, NKp30 Stalk S a NKp30 Stalk T činila přibližně 18,9 kDa.

## 5.5 DEGLYKOSYLACE LBD S A NKp30 STALK S

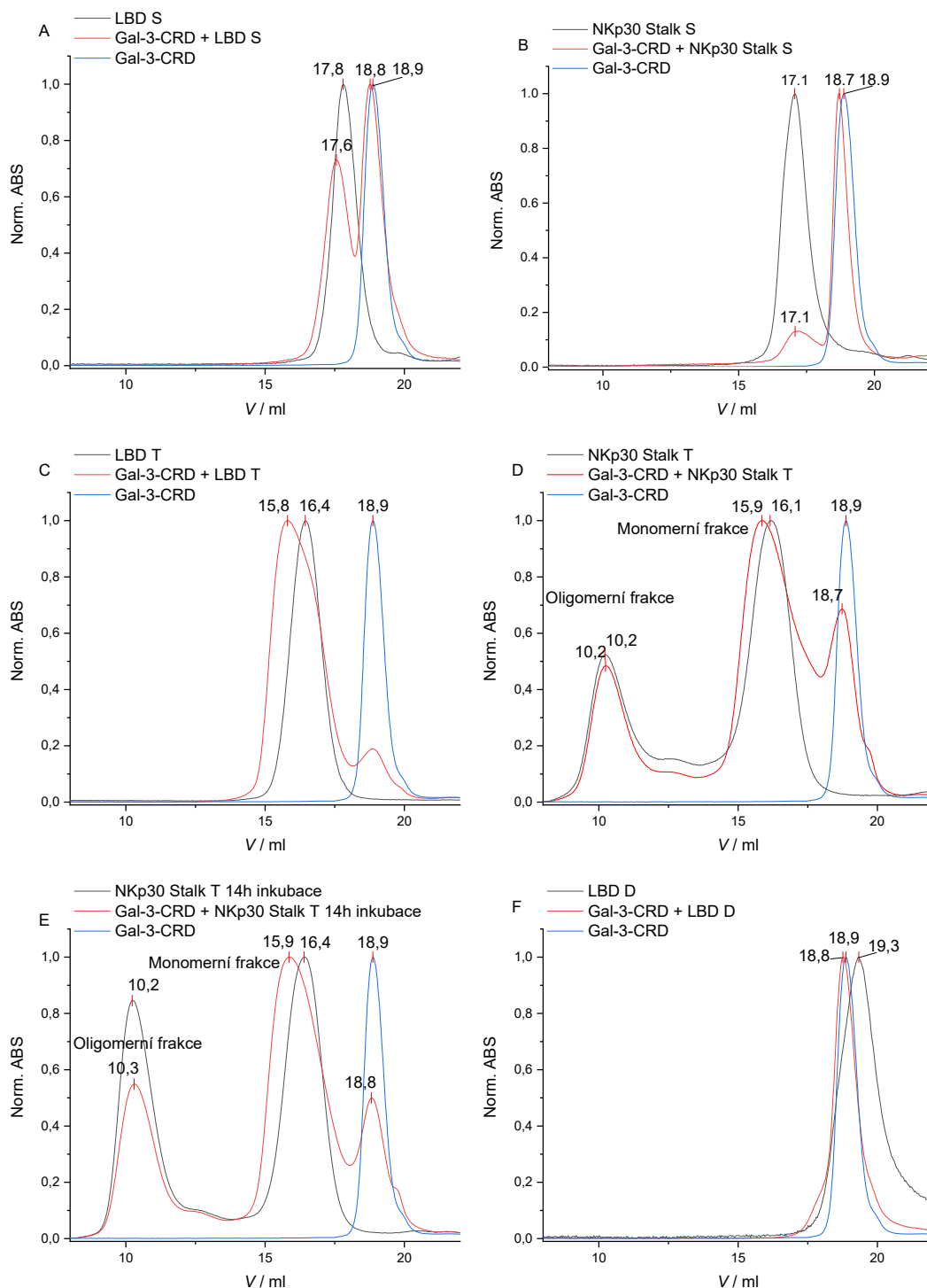
Část proteinů s uniformní N-glykosylací manosového typu byla deglykosylována fúzní endoglykosidasou EndoF1-GST (Tabulka 3, str. 51) ve dvou variantách, a to při 37 °C a 4 °C. Tento fúzní protein po deglykosylaci zanechával na daném N-glykosylačním místě jeden N-acetylglukosamin. Během deglykosylace při 37 °C NKp30 Stalk S precipitoval, tudíž nebyl použit pro další experimenty. Zbylé proteiny [deglykosylovaná ligand vázající doména receptoru NKp30 (*LBD D*, z *angl. deglycosylated ligand binding domain*), vzniklá při 4 °C a 37 °C a deglykosylovaný receptor NKp30 se „stalk“ doménou (*NKp30 Stalk D*) vzniklý při 4 °C] byly odděleny od EndoF1 přes kolonku GSTrapFF 5 ml. Následně bylo zjištěno, že proteinu NKp30 Stalk D vzniklého při 4 °C bylo vyprodukováno příliš malé množství, proto rovněž nebyl použit pro další experimenty. Pro další experimenty byl použit pouze LBD D vzniklý při 4 °C, zatímco LBD D vzniklý při 37 °C sloužil pouze jako rezervní vzorek.

## 5.6 CHARAKTERIZACE INTERAKCE GAL-3-CRD S VARIANTAMI RECEPTORU NKp30 POMOCÍ ANALYTICKÉ GPC

Interakce variant receptoru NKp30 s Gal-3-CRD byla charakterizována pomocí analytické GPC, za použití kolony Superdex 200 Increase 10/300 GL. Nejprve byla provedena dialýza Gal-3-CRD, pro odstranění navázané laktosy, kterou obsahoval eluční pufr pro Laktosovo-Sepharosovou kolonu. Poté byla provedena analytická GPC jednotlivých proteinů, pro zjištění jejich elučních objemů. Následně byly připraveny směsné vzorky uvedené v tabulce 4, načež s nimi byla také provedena analytická GPC. Poté byly sestrojeny grafy, do nichž byly přes sebe vyneseny chromatografické křivky, a to samotného Gal-3-CRD, samotné jedné z variant receptoru NKp30, a nakonec chromatografická křivka směsného vzorku Gal-3-CRD s danou variantou receptoru NKp30. Píky byly následně normalizovány na jednotkovou absorbanci, pro lepší rozlišení posunu píků z měření směsného vzorku vůči píkům z měření samostatných proteinů (Obrázek 17, str. 54).

**Tabulka 4: Směsné vzorky proteinů připravené pro analytickou GPC.** Směsi proteinů byly připravovány v molárním poměru 1:1. V případě NKp30 Stalk S byla použita pouze monomerní frakce.

| Číslo směsného vzorku | Směsné vzorky proteinů                  |
|-----------------------|---|
| 1                     | Gal-3-CRD + LBD S                       |
| 2                     | Gal-3-CRD + NKp30 Stalk S               |
| 3                     | Gal-3-CRD + LBD T                       |
| 4                     | Gal-3-CRD + NKp30 Stalk T               |
| 5                     | Gal-3-CRD + NKp30 Stalk T (14 h inkub.) |
| 6                     | Gal-3-CRD + LBD D                       |



**Obrázek 17: Proložené chromatogramy analytických GPC samostatných variant receptoru NKp30 s jejich směsnými vzorky**

Chromatografické křivky Gal-3-CRD byly obarveny modře, chromatografické křivky samostatných variant receptoru NKp30 byly obarveny černě a chromatografické křivky směsných vzorků Gal-3-CRD s danou variantou receptoru NKp30 byly obarveny červeně. Grafy závislosti absorbance při 280 nm (ABS) na objemu ( $V$ ) byly normalizovány na jednotkovou absorbanci ( $Norm. ABS$ ) a počátek osy  $x$  byl posunut na objem 8 ml, tedy na mrtvý objem kolony Superdex 200 Increase 10/300 GL. Taktéž byly do grafů vyneseny maxima elučních objemů. Z grafu A je patrné, že LBD S, který se nachází pouze v monomerní formě neinteraguje s Gal-3-CRD, jelikož nedošlo k posunu elučního objemu směsného vzorku vůči elučního objemu samostatného LBD S.

(pokračování popisu obrázku na další stránce)

*(pokračování popisu obrázku z předchozí stránky)*

Analogický výsledek byl zaznamenán i v případě NKp30 Stalk S (graf B) a LBD D (graf F), kdy rovněž nedošlo k posunu elučního objemu směsného vzorku vůči elučnímu objemu samostatných variant NKp30. Pro ověření vazby Gal-3-CRD na NKp30 Stalk S byla použita pouze monomerní frakce receptoru. Opačná situace však nastala v případě NKp30 Stalk T (graf D, E) a LBD T (graf C), kdy došlo k výraznému posunu elučních objemů směsných vzorků vůči elučním objemům samostatných variant NKp30. Při porovnání grafu D a grafu E je patrné, že přítomnost Gal-3-CRD nezpůsobuje disociaci oligomerní frakce NKp30 Stalk T ani po 14h inkubaci.

Z výsledků analytické GPC na obrázku 17 (str. 54) je patrné, že v případě deglykosylované a uniformně N-glykosylovaných variant receptoru NKp30, tedy LBD D, LBD S a NKp30 Stalk S (Grafy F, A, B – Obrázek 17, str. 54), nedošlo k posunu elučních objemů příslušících směsnému vzorku, vůči elučním objemům samostatně analyzovaných proteinů. Naopak v případě komplexně N-glykosylovaných variant receptoru, tedy LBD T a monomerní frakce NKp30 Stalk T (Grafy C, D, E – Obrázek 17, str. 54) došlo k posunu elučních objemů směsných vzorků, vůči elučním objemům proteinů analyzovaných samostatně. Z černých křivek grafů D a E na obrázku 17 (str. 54) je také patrné, že se ve vzorku NKp30 Stalk T nachází také oligomerní frakce tohoto proteinu, která ale s Gal-3-CRD neinteraguje. Pro ověření stability oligomerů NKp30 Stalk T a vlivu přítomnosti Gal-3-CRD na jejich disociaci bylo provedeno měření s 14hodinovou inkubací při 4 °C vzorku samostatného NKp30 Stalk T a směsného vzorku NKp30 Stalk T s Gal-3-CRD. Výsledek následného měření inkubovaných vzorků je vidět na obrázku 17 (str. 54), graf E, kde je patrné, že nedochází k disociaci oligomerů jak v samostatném vzorku NKp30 Stalk T, tak v směsném vzorku s Gal-3-CRD. Rozdílem mezi grafy D a E je výraznější posun maxima elučního objemu směsného vzorku oproti samostatnému NKp30 Stalk T (monomerní frakce) v případě grafu E. Zdá se tedy, že prodloužená inkubace vedla k posílení vzájemné interakce.

## 6 DISKUZE

Důležitým milníkem této práce byla příprava dostatečného množství Gal-3-CRD pro další experimenty s NKp30. Nativní varianta galektinu-3 nebyla připravována z důvodu možné nekovalentní oligomerizace skrze její N-koncovou doménu [38]. Výtěžek Gal-3-CRD činil 4 mg na litr buněčné suspenze. Byly také připraveny varianty receptoru NKp30, které byly použity k přípravě směsných roztoků jednotlivých variant NKp30 s Gal-3-CRD v molárním poměru 1:1. Pomocí analytické GPC bylo zjišťováno, která z variant NKp30 s Gal-3-CRD interaguje. Ukázalo se, že Gal-3-CRD interaguje s LBD T a monomerní frakcí NKp30 Stalk T, které byly produkovány v buněčné linii HEK293T, jež poskytuje komplexní N-glykosylaci. Zatímco s LBD S a NKp30 Stalk S, které byly produkovány v buněčné linii HEK293S GnT $\Gamma$ , nebyla zaznamenána žádná interakce. Buněčná linie HEK293S GnT $\Gamma$  poskytuje uniformní N-glykosylaci manosového typu, jelikož u ní není exprimována N-acetylglukosaminyltransferasa I. Galektin-3 nevykazuje afinitu vůči manose, ani  $\alpha$ -vázaným oligomanosidům [52], proto Gal-3-CRD nevykazovala afinitu vůči proteinům exprimovaným v buněčné linii HEK293S GnT $\Gamma$ , jejichž oligosacharidy obsahovaly  $\alpha$ -vázané manosy. Galektin-3 naopak vykazuje afinitu vůči  $\beta$ -1,2-vázaným oligomanosidům, které se vyskytují na povrchu kvasinky *Candida albicans* [52]. Mezi LBD D a Gal-3-CRD rovněž nebyla zaznamenána žádná interakce, a to díky absenci N-vázaných oligosacharidů. Bylo také potvrzeno, že se N-glykosylovaný receptor NKp30 se „stalk“ doménou nachází v roztoku jak v monomerní, tak v oligomerní formě, jak již bylo popsáno v publikaci Skořepa, O. a kol. [25] a Herrmann, J. a kol. [53]. V návaznosti na tuto studii bylo v této práci zjišťováno, zdali přítomnost Gal-3-CRD zapříčiní disociaci oligomerní frakce. Ukázalo se ale, že Gal-3-CRD s touto frakcí neinteraguje. Při srovnání elučních profilů pro LBD T a NKp30 Stalk T (Obrázek 17, str. 54) se zdá, že se Gal-3-CRD váže lépe na LBD T, než na monomerní frakci NKp30 Stalk T. To by mohlo znamenat, že přítomnost „stalk“ domény zabraňuje tvorbě komplexu s Gal-3-CRD, a vysvětlovat proč se Gal-3-CRD neváže na oligomerní frakci NKp30 Stalk T. Z výsledků předchozího výzkumu je zřejmé, že oligomerizace NKp30 je závislá na přítomnosti „stalk“ domény a současně i N-glykosylace, především glykosylace na Asn-42 (Obrázek 3, str. 18). Je tedy možné, že se vazebné místo pro Gal-3-CRD nachází v těsném okolí Asn-42, a proto není dostupné v oligomerní formě NKp30 Stalk T.

Předmětem dalšího zkoumání by mohl být vliv přítomnosti Gal-3-CRD na formaci této oligomerní frakce NKp30 a příprava glykosylačních mutantů variant receptoru NKp30 v buněčné linii HEK293T. Analýza afinity Gal-3-CRD vůči jednotlivým



glykosylačním mutantům variant NKp30 pomocí vhodných biofyzikálních metod, jako je například analytická ultracentrifugace (AUC), izotermální titrační kalorimetrie či termoforéza, by mohla přispět k pochopení mechanismu inhibice NKp30 galektinem-3. V případě vazby Gal-3-CRD na NKp30 v blízkosti jeho vazebného místa pro aktivační ligandy, by aktivace NKp30 mohla být bráněna stericky. Naopak v případě vazby v blízkosti „stalk“ domény NKp30 by mohl být bráněn přenos signálu znemožněním zasunutí „stalk“ domény do membrány a následné aktivace CD3 $\zeta$ , případně zabránění oligomerizace receptoru NKp30. Tato zjištění by mohla poskytnout dostatečné podklady pro následné studie interakce galektinu-3 s NKp30 na NK buňkách.

Z obrázku 14 (str. 50) je patrné že, denaturovaná Gal-3-CRD v neredukujícím prostředí se na SDS-PAGE jeví jako dimer, naopak v redukujícím prostředí je přítomna pouze monomerní forma. Jedná se tedy pravděpodobně o kovalentní dimer, který vznikl propojením dvou Gal-3-CRD pomocí disulfidického můstku. Na obrázku 7 (str. 46) byl žlutou barvou vyznačen jediný cystein, který Gal-3-CRD nese, a skrze který by pravděpodobně mohl dimerizovat. Naopak při analytické GPC se Gal-3-CRD jevil jako pouze monomerní protein (Obrázek 15, str. 51), což může být způsobeno možnou interakcí se stacionární fází použité kolony, která je složena z dextranů a agarosy. Dřívější studie od Hsu, D. K. a kol. potvrdila, že Gal-3-CRD může při SDS-PAGE v neredukujících podmínkách dimerizovat, či dokonce tvořit vyšší oligomery až polymerní struktury, nicméně velká část zůstává pořád v monomerní formě. V této studii se také ukázalo, že malá část vzorku Gal-3-CRD může oligomerizovat i za redukujících podmínek [54], což na obrázku 14 (str. 50) zaznamenáno nebylo. Předmětem dalších experimentů by mohla být AUC vzorků Gal-3-CRD o různých koncentracích, pro finální ověření dimerizace, či oligomerizace. Pro ověření, zdali je dimerizace způsobena vytvořením disulfidického můstku by v budoucnu mohla být provedena hmotnostní spektrometrie.

## 7 ZÁVĚR

- Gen pro Gal-3-CRD byl úspěšně vložen do expresního vektoru pOPINE, kterým poté byly transformovány bakterie *E. coli* T7, kterými byl Gal-3-CRD exprimován.
- Byly produkovány varianty receptoru NKp30:
  - LBD S a NKp30 Stalk S, byly úspěšně produkovány v buněčné linii HEK293S GnTI, která poskytovala uniformní N-glykosylaci manosového typu.
  - LBD T a NKp30 Stalk T, byly úspěšně produkovány v buněčné linii HEK293T, která poskytovala komplexní N-glykosylaci.
  - LBD D, byla úspěšně vytvořena deglykosylací LBD S, pomocí fúzní endoglykosidasy EndoF1-GST, zatímco deglykosylace NKp30 Stalk S, která by dala za vznik NKp30 Stalk D úspěšná nebyla.
- Analytickou GPC bylo ověřeno:
  - Stabilita oligomerní frakce NKp30 Stalk T po 14hodinové inkubaci, kdy bylo zjištěno, že jsou tyto oligomery v tomto časovém úseku stabilní.
  - Vliv přítomnosti Gal-3-CRD na oligomerní frakci NKp30 Stalk T, kdy bylo zjištěno, že přítomnost Gal-3-CRD neindukuje disociaci těchto oligomerů ani po 14hodinové inkubaci.
  - Vazba Gal-3-CRD na varianty receptoru NKp30, kdy bylo zjištěno, že se Gal-3-CRD váže pouze na komplexně glykosylované varianty NKp30, tedy LBD T a monomerní frakci NKp30 Stalk T, zatímco na LBD S, NKp30 Stalk S a LBD D se Gal-3-CRD neváže.

## 8 SEZNAM LITERATURY

1. Parkin, J.; Cohen, B.: An overview of the immune system. *Lancet* **2001**, 357, 1777-1789.
2. Medzhitov, R.; Janeway, C.: Innate Immunity. *New England Journal of Medicine* **2000**, 343, 338-344.
3. Chaplin, D.: Overview of the human immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2006**, 117, S430-S435.
4. Bonilla, F.A.; Oettgen, H.C.: Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2010**, 125, S33-S40.
5. Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T.; Ugolini, S.: Functions of natural killer cells. *Nature immunology* **2008**, 9, 503-510.
6. Mrozek, E.; Anderson, P.; Caligiuri, M.A.: Role of interleukin-15 in the development of human CD56<sup>+</sup> natural killer cells from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood* **1996**, 87, 2632-2640.
7. Fehniger, T.A.; Caligiuri, M.A.: Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* **2001**, 97, 14-32.
8. Caligiuri, M.A.: Human natural killer cells. *Blood* **2008**, 112, 461-469.
9. Ferlazzo, G.; Münz, C.: NK Cell Compartments and Their Activation by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* **2004**, 172, 1333-1339.
10. Cooper, M.A.; Fehniger, T.A.; Turner, S.C.; Chen, K.S.; Ghaheri, B.A.; Ghayur, T.; Carson, W.E.; Caligiuri, M.A.: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset. *Blood* **2001**, 97, 3146-3151.
11. Cerwenka, A.; Lanier, L.L.: Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature reviews. Immunology* **2016**, 16, 112-123.
12. Cooper, M.A.; Colonna, M.; Yokoyama, W.M.: Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO reports* **2009**, 10, 1103-1110.
13. Bryceson, Y.T.; Long, E.O.: Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Current opinion in immunology* **2008**, 20, 344-352.
14. Mariuzza, R.A.; Li, Y.: Structural Basis for Recognition of Cellular and Viral Ligands by NK Cell Receptors. *Frontiers in immunology* **2014**, 5, 123.

15. Koch, J.; Steinle, A.; Watzl, C.; Mandelboim, O.: Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends in immunology* **2013**, *34*, 182-191.
16. Pegram, H.J.; Andrews, D.M.; Smyth, M.J.; Darcy, P.K.; Kershaw, M.H.: Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and cell biology* **2011**, *89*, 216-224.
17. Lanier, L.L.; Corliss, B.; Phillips, J.H.: Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunological reviews* **1997**, *155*, 145-154.
18. Anfossi, N.; Andre, P.; Guia, S.; Falk, C.S.; Roetynck, S.; Stewart, C.A.; Bresnahan, V.; Frassati, C.; Reviron, D.; Middleton, D.; Romagne, F.; Ugolini, S.; Vivier, E.: Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* **2006**, *25*, 331-342.
19. Lanier, L.L.: NK cell recognition. *Annual review of immunology* **2005**, *23*, 225-274.
20. Kruse, P.H.; Matta, J.; Ugolini, S.; Vivier, E.: Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology and cell biology* **2014**, *92*, 221-229.
21. Pende, D.; Parolini, S.; Pessino, A.; Sivori, S.; Augugliaro, R.; Morelli, L.; Marcenaro, E.; Accame, L.; Malaspina, A.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Moretta, L.; Moretta, A.: Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* **1999**, *190*, 1505-1516.
22. Joyce, M.G.; Tran, P.; Zhuravleva, M.A.; Jaw, J.; Colonna, M.; Sun, P.D.: Crystal structure of human natural cytotoxicity receptor NKp30 and identification of its ligand binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 6223-6228.
23. Hartmann, J.; Tran, T.V.; Kaudeer, J.; Oberle, K.; Herrmann, J.; Quagliano, I.; Abel, T.; Cohnen, A.; Gatterdam, V.; Jacobs, A.; Wollscheid, B.; Tampe, R.; Watzl, C.; Diefenbach, A.; Koch, J.: The stalk domain and the glycosylation status of the activating natural killer cell receptor NKp30 are important for ligand binding. *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287*, 31527-31539.
24. Memmer, S.; Weil, S.; Beyer, S.; Zoller, T.; Peters, E.; Hartmann, J.; Steinle, A.; Koch, J.: The Stalk Domain of NKp30 Contributes to Ligand Binding and Signaling of a Preassembled NKp30-CD3 $\zeta$  Complex. *The Journal of biological chemistry* **2016**, *291*, 25427-25438.
25. Skořepa, O.; Pazický, S.; Kalousková, B.; Bláha, J.; Abreu, C.; Ječmen, T.; Rosůlek, M.; Fish, A.; Sedivy, A.; Harlos, K.; Dohnálek, J.; Skálová, T.; Vaněk,

- O.: Natural Killer Cell Activation Receptor NKp30 Oligomerization Depends on Its N-Glycosylation. *Cancers* **2020**, *12*, 1998.
26. Kaifu, T.; Escaliere, B.; Gastinel, L.N.; Vivier, E.; Baratin, M.: B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2011**, *68*, 3531-3539.
  27. Wang, W.; Guo, H.; Geng, J.; Zheng, X.; Wei, H.; Sun, R.; Tian, Z.: Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *The Journal of biological chemistry* **2014**, *289*, 33311-33319.
  28. Lis, H.; Sharon, N.: Lectins as molecules and as tools. *Annual Review of Biochemistry* **1986**, *55*, 35-67.
  29. Lis, H.; Sharon, N.: Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical reviews* **1998**, *98*, 637-674.
  30. Taylor, M.E.; Drickamer, K.; Schnaar, R.L.; Etzler, M.E.; Varki, A.: Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. *Essentials of Glycobiology* **2015**.
  31. Barondes, S.H.: Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in biochemical sciences* **1988**, *13*, 480-482.
  32. Sharon, N.; Lis, H.: Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. *Science* **1972**, *177*, 949-959.
  33. Vijayan, M.; Chandra, N.: Lectins. *Current opinion in structural biology* **1999**, *9*, 707-714.
  34. Yang, R.Y.; Rabinovich, G.A.; Liu, F.T.: Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **2008**, *10*, e17.
  35. Leffler, H.; Carlsson, S.; Hedlund, M.; Qian, Y.; Poirier, F.: Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal* **2002**, *19*, 433-440.
  36. Powell, L.D.; Varki, A.: I-type Lectins. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 14243-14246.
  37. Liu, F.T.; Rabinovich, G.: Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5*, 29-41.
  38. Dumic, J.; Dabelic, S.; Flögel, M.: Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica et biophysica acta* **2006**, *1760*, 616-635.

39. Song, L.; Tang, J.W.; Owusu, L.; Sun, M.Z.; Wu, J.; Zhang, J.: Galectin-3 in cancer. *Clinica Chimica Acta* **2014**, *431*, 185-191.
40. Mazurek, N.; Conklin, J.; Byrd, J.C.; Raz, A.; Bresalier, R.S.: Phosphorylation of the  $\beta$ -Galactoside-binding Protein Galectin-3 Modulates Binding to Its Ligands\*. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 36311-36315.
41. Takenaka, Y.; Fukumori, T.; Yoshii, T.; Oka, N.; Inohara, H.; Kim, H.R.C.; Bresalier, R.S.; Raz, A.: Nuclear Export of Phosphorylated Galectin-3 Regulates Its Antiapoptotic Activity in Response to Chemotherapeutic Drugs. *Molecular and cellular biology* **2004**, *24*, 4395-4406.
42. Henderson, N.C.; Sethi, T.: The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunological reviews* **2009**, *230*, 160-171.
43. Brittoli, A.; Fallarini, S.; Zhang, H.; Pieters, R.J.; Lombardi, G.: "In vitro" studies on galectin-3 in human natural killer cells. *Immunology letters* **2018**, *194*, 4-12.
44. Califice, S.; Castronovo, V.; Brûle, F.V.D.: Galectin-3 and cancer (Review). *International journal of oncology* **2004**, *25*, 983-1075.
45. Nangia-Makker, P.; Honjo, Y.; Sarvis, R.; Akahani, S.; Hogan, V.; Pienta, K.J.; Raz, A.: Galectin-3 Induces Endothelial Cell Morphogenesis and Angiogenesis. *The American journal of pathology* **2000**, *156*, 899-909.
46. Saraboji, K.; Håkansson, M.; Genheden, S.; Diehl, C.; Qvist, J.; Weininger, U.; Nilsson, U.J.; Leffler, H.; Ryde, U.; Akke, M.; Logan, D.T.: The Carbohydrate-Binding Site in Galectin-3 Is Preorganized To Recognize a Sugarlike Framework of Oxygens: Ultra-High-Resolution Structures and Water Dynamics. *Biochemistry* **2012**, *51*, 296-306.
47. Yoshii, T.; Fukumori, T.; Honjo, Y.; Inohara, H.; Kim, H.R.C.; Raz, A.: Galectin-3 Phosphorylation Is Required for Its Anti-apoptotic Function and Cell Cycle Arrest\*. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 6852-6857.
48. Inohara, H.; Akahani, S.; Raz, A.: Galectin-3 Stimulates Cell Proliferation. *Experimental cell research* **1998**, *245*, 294-302.
49. Tsuboi, S.; Sutoh, M.; Hatakeyama, S.; Hiraoka, N.; Habuchi, T.; Horikawa, Y.; Hashimoto, Y.; Yoneyama, T.; Mori, K.; Koie, T.; Nakamura, T.; Saitoh, H.; Yamaya, K.; Funyu, T.; Fukuda, M.; Ohyama, C.: A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans. *The EMBO journal* **2011**, *30*, 3173-3185.
50. Li, Z.; Michael, I.P.; Zhou, D.; Nagy, A.; Rini, J.M.: Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, 5004-5009.

51. Skořepa, O.: Strukturní studium potkaního NK buněčného receptoru NKR-P1B a jeho ligandu Clrb. *Diplomová práce, PřF UK, Katedra Biochemie* **2016**.
52. Fradin, C.; Poulain, D.; Jouault, T.:  $\beta$ -1,2-Linked Oligomannosides from *Candida albicans* Bind to a 32-Kilodalton Macrophage Membrane Protein Homologous to the Mammalian Lectin Galectin-3. *Infection and immunity* **2000**, *68*, 4391-4398.
53. Herrmann, J.; Berberich, H.; Hartmann, J.; Beyer, S.; Davies, K.; Koch, J.: Homooligomerization of the activating natural killer cell receptor NKp30 ectodomain increases its binding affinity for cellular ligands. *The Journal of biological chemistry* **2014**, *289*, 765-777.
54. Hsu, D.K.; Zuberi, R.I.; Liu, F.T.: Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 14167-14174.