

Abstrakt

NK buňky hrají klíčovou roli v imunitní obraně proti nádorům, buňkám infikovaným viry a patogenům. Cílové buňky rozpoznávají bez předchozí senzitivace a odstraňují je díky cytotoxické aktivitě, sekreci cytokinů a chemokinů. NK buňky exprimují na svém povrchu aktivační a inhibiční receptory, které zprostředkovávají vnější signály. Hlavní roli mezi aktivačními receptory hraje člen rodiny receptorů přirozené cytotoxicity – receptor NKp30. NKp30 rozpoznává širokou škálu ligandů, včetně těch, které se podílejí na maligních procesech, jako je B7-H6, BAG-6 a galektin-3. Galektin-3 (Gal-3) je buněčný protein, který hraje více rolí, od genové exprese po růst nádoru a obranu před patogeny. Dokáže potlačit funkce NK buněk vazbou na receptor NKp30 a je cílem nové protinádorové terapie. Nicméně je málo známo o přesném mechanismu interakce NKp30 s galektinem-3, který je náročný na studium kvůli několika faktorům. Za prvé, přirozený Gal-3 může vytvářet oligomerní struktury prostřednictvím svých N- a C-koncových domén a tvořit dimery prostřednictvím lichého cysteinu ve své doméně rozpoznávající sacharidy (CRD), což může interferovat s měřeními. Za druhé, doména vázající ligand (LBD) NKp30 nese tři *N*-glykosylační místa (Asn42, Asn68, Asn121) zapojená do vazby ligandů, z nichž každé k ní přispívá jiným způsobem.

Tato diplomová práce má za cíl lépe porozumět interakci mezi NKp30 a galektinem-3 pomocí metod a přístupů strukturní biochemie. K dosažení tohoto cíle byly *N*-glykosylační mutanty NKp30 LBD exprimovány v buněčné linii HEK293T a mutovaná (C173S) forma Gal-3 CRD byla produkována v *E. coli*. Studium vazebné afinity této interakce bylo provedeno pomocí dvou komplementárních metod: mikrotermoforézy a analytické ultracentrifugace. Dalším cílem bylo krystalizovat komplex Gal-3:NKp30 a vyřešit jeho strukturu pomocí rentgenové krystalografie, což však dosud vedlo pouze ke krystalizaci mutované formy Gal-3 CRD neobsahující cystein 173 a úspěšnému vyřešení jeho struktury.

Klíčová slova

Galektin-3, NKp30, NK buňky, HEK293T, *N*-glykosylace