

## ABSTRAKT

NK buňky (z angl. natural killer cells, přirozeně zabíječské buňky) buňky hrají důležitou roli při rozpoznání a eliminaci infikovaných, poškozených či nádorových buněk bez nutnosti předchozího kontaktu s nimi. Jejich cytotoxicita je zprostředkována aktivačními receptory na jejich povrchu, jako je receptor NKp80 (z angl. Natural Killer protein 80 kDa). NKp80 se váže na ligand AICL, který je konstitutivně exprimován na myeloidních buňkách. Zvýšená exprese AICL, např. na nádorových buňkách, vede k aktivaci NK buněk exprimujících receptor NKp80. Interakce NKp80:AICL je proto slibným imunoterapeutickým cílem pro léčbu myeloidní leukémie.

Struktura obou proteinů dosud nebyla známá, a proto jsme se v práci zaměřili na úspěšnou produkci extracelulární domény těchto proteinů za tímto účelem. Při produkci receptoru NKp80, jsme zavedli do „stalk“ oblasti sérii mutací, kde byly jednotlivé cysteiny nahrazeny seriny. Pomocí zavedených mutací jsme studovali jejich vliv na produkci, stabilitu a tvorbu homodimeru. Zavedené mutace významně zvýšily výtěžek produkce, a proto byl protein připraven ve větším množství za účelem krystalizace proteinu. Krystalizace vedla k objasnění dosud neznámé struktury homodimeru NKp80 s rozlišením 2,9 Å. Při přípravě proteinů ke krystalizaci bylo ovšem zjištěno, že dochází k částečné proteolýze N-terminální oblasti během deglykosylace.

Na rozdíl od NKp80 se příprava ligandu AICL ukázala jako poměrně složitá, pravděpodobně kvůli intracelulární retenci proteinu a degradaci proteinu z důvodu nesprávného složení. Pro přípravu proteinu byly proto zkoumány různé přístupy, jako prodloužení „stalk“ oblasti na základě podobnosti s homologním proteinem CD69, intracelulární příprava proteinu, příprava proteinu za použití hmyzích buněk a další. Nakonec byl navržen a vyroben fúzní konstrukt AICL s Fc fragmentem na C-konci s výtěžkem 30 mg na 400 ml média. Bylo zkoumáno štěpení fúzního konstruktu a navržena optimalizace štěpení za účelem přípravy samotného proteinu AICL.

Mezi budoucí cíle patří produkce ligandu AICL za účelem objasnění jeho struktury, studium interakce mezi receptorem a ligandem a tím plné prozkoumání terapeutického potenciálu tohoto interakčního páru.

## KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňka, NKp80, AICL, krystalizace proteinů, rentgenová krystalografie