

**Struktura a funkce C-lektinových receptorů NK buněk studovaná pomocí rekombinantní exprese a proteinové krystalografie**

Abstrakt dizertační práce

**Ondřej Vaněk**

Školitel: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

NK buňky (přírození zabíječi) byly popsány pro jejich schopnost spontánně zabíjet určité allogenní nádorové linie, a to bez jakékoliv předchozí senzitivace. NK buňky jsou součástí neadaptivní imunitní odpovědi s velmi krátkou reakční dobou vůči patogenům, jakými jsou například viry, intracelulární bakterie a parazité. Jsou také zodpovědné za eliminaci některých rakovinných buněk a mohou tak bránit rozvoji nádorové transformace a bojovat proti rozšiřování metastáz. Aktivita NK buněk je regulována pomocí rovnováhy mezi aktivačními a inhibičními signály zprostředkovanými povrchovými receptory NK buněk. Ze strukturního hlediska může být většina NK buněčných povrchových receptorů klasifikována jako C-lektinové nebo imunoglobulinové receptory. Jednou z mnoha podskupin C-lektinů jsou i lymfocytární receptory II. typu, které jsou exprimovány na NK buňkách.

Předkládaná práce měla dva hlavní cíle. Prvním bylo nalezení vhodných expresních a purifikačních systémů pro vybrané C-lektinové receptory NK buněk a druhým pak provést jejich biochemickou a strukturní charakterizaci. Pro jejich splnění byly stanoveny tyto konkrétní podcíle: najít renaturační a purifikační protokol, který by poskytoval dostatečné množství lidského CD69 a potkaního NKR-P1A a B pro jejich strukturní a funkční studie; studovat strukturu CD69 a NKR-P1 receptorů pomocí proteinové krystalografie; nalézt eukaryotický expresní systém vhodný pro rekombinantní produkci nativních NK buněčných receptorů a najít vhodný postup afinitní purifikace rekombinantních proteinů sekretovaných do kultivačního média; a také zvládnutí postupů sedimentační analýzy rekombinantních proteinů pomocí analytické ultracentrifugy.

Vytčených cílů bylo dosaženo a výsledky práce jsou dokumentovány v přiložených publikacích a manuskriptech. V případě receptorů CD69 a NKR-P1 se jednalo především o optimalizaci expresního konstruktů a také pečlivé vyladění podmínek renaturace daných proteinů, což umožnilo jak jejich biochemické studium (např. sacharidová vazebná specifita, *in vivo* stabilita a kooperativita vazby u CD69), tak jejich krystalizaci a vyřešení trojrozměrné struktury – pro CD69 byla získána struktura s doposud nejvyšším známým rozlišením a pro NKR-P1 zase naopak vůbec první krystalová struktura jakéhokoli zástupce této rodiny NK buněčných receptorů; tato struktura navíc obsahuje unikátní u NK buněčných receptorů dosud nepopsaný strukturní motiv. Strukturní práce byla navíc podložena molekulárním modelováním a Ramanovou spektroskopií, poukazujícími na možné strukturní mechanismy určující vazebnou specifitu daných receptorů.

Některé z C-lektinových receptorů NK buněk se nám v bakteriálním expresním systému připravit nepodařilo. Proto jsme vytvořili eukaryotický expresní systém, založený na tranzientní transfekci suspenzní lidské HEK293 buněčné linie adaptované na bezsérové médium, který navíc umožňuje i studovat vliv dimerizace a glykosylace na vazebné vlastnosti receptorů. Nejprve bylo třeba optimalizovat proces transfekce pro dosažení co největší transfekční účinnosti a výtěžku produkce, za tímto účelem jsme použili dva reportérové proteiny: sekretovanou alkalickou fosfatase a zelený fluorescentní protein. Při expresi pomocí velkoobjemové tranzientní transfekce ve čtverhranných láhvích a purifikace přes histidinovou kotvu s následnou gelovou filtrací se pro modelové potkaní NK buněčné receptory NKR-P1B a Clrb konečný výtěžek čistých proteinů pohyboval mezi 1 - 5 mg na litr produkčního média.