

Oponentský posudek diplomové práce Jana Bláhy „Příprava a studium lidského lymfocytárního receptoru LLT1“

Diplomová práce Jana Bláhy se zabývá produkcí extracelulární formy receptoru lidských zabijčeských buněk LLT1 a jeho dvou mutantů rekombinantní expresí v buňkách HEK293. Diplomant připravil expresní plasmidy, ověřil, že přirozená sekvence ektodomény vede k expresi nestabilního a agregujícího proteinu, připravil mutanty v místech kódujících nepárový cysteinový zbytek a nakonec připravil, purifikoval, charakterisoval a zkrystaloval mutovaný konstrukt L2-H176C, který dokonce poskytl rentgenově difrakční data umožňující řešení 3D struktury tohoto proteinu. To je na diplomovou práci skvělý úspěch.

Vedle toho diplomant ověřil vlastnosti různě glykosylovaných forem tohoto rekombinantního proteinu a osvojil si celou řadu molekulárně biologických a strukturně-biologických metod, od PCR, klonování rekombinantní DNA, práce s tkáňovými kulturami lidských buněk, až po pokročilé metody purifikace a charakterisace proteinů a řešení jejich 3D struktury.

Práce je formálně zpracována velmi dobře, číší z ní nadšení autora pro věc, které je velmi nakažlivé. Někdy ho autor úplně neovládl (popis hledání krystalizačních podmínek se sice skvěle čte, ale někdy působí až esejisticky a stylově se jako Výsledky diplomové práce úplně nehodí), ale to nevadí. Pár překlepů a gramatických chyb (hlavně v čárkách v delších souvětích, překlepy typu „svaží“ místo „savčí“ na str. 12 apod.) neruší a pro oponenta jsou vítanou záminkou, aby měl práci co vytknout.

Četba této inspirativní práce ve mně vyvolala následující otázky a náměty:

Drobné formální výhrady:

-výraz „podmínka měla složení“ (str. 66) je ošklivý krystalografický slang, autor by se mu měl vyhnout;

-ve Výsledcích jsem nenašel (s výjimkou rozlišení) žádnou charakterisaci kvality strukturního modelu LLT1, který autor prezentuje (apoň R faktor a Rfree by tam měly být);

- obr. 20 s SDS PAGE purifikovaného proteinu L2-H176C je přesvědčivý a interpretace, že se jedná o dvě glykoformy téhož proteinu, je pravděpodobná. Autor však bohužel neukazuje výsledek deglykosylačního experimentu, který pak popisuje;

-naproti tomu, uvádění obrázků sekvenačních gelů (obr. 18) je v r. 2012 už obsolentní, autor má výsledků dost i bez toho.

Dotazy k diskusi:

od čeho je odvozen diplomantem použitý N-terminální sekreční signál, který řídí export rekombinantního proteinu do média ?

zkoušel diplomant potvrdit publikovanou interakci LLT1 s proteinem NKRP1? Navrhl by strukturní nebo biofyzikální experimenty, které by tuto interakci potvrdily nebo vyvrátily?

Těším se na odpovědi. Závěrem bych rád konstatoval, že práci Jana Bláhy považuju za mimořádně kvalitní, velmi zajímavou diplomovou práci a plně ji doporučuji k obhajobě.

V Praze, 22.5. 2012

Jan Konvalinka