

Oponentský posudek diplomové práce

Diplomovou práci "Příprava dimerního leukocytárního aktivačního antigenu CD69" vypracovala Ivana Borovičková, studentka Přírodovědecké fakulty UK, v Laboratoři architektury proteinů Prof. RNDr. Karla Bezoušky, CSc., pod vedením Mgr. Daniela Kavana. Laboratoř Prof. Bezoušky se dlouhodobě věnuje studiu struktury a vazebných vlastností molekuly CD69, která je znakem aktivovaných buněk imunitního systému, mezi které patří přirozené zabijeecké buňky-NK, monocyty /makrofágy, T a B lymfocyty.

Příspěvkem diplomové práce k tomuto studiu byla příprava solubilní formy kovalentně vázaného dimeru C-koncové extracelulární části CD69 molekuly pro následné strukturální a vazebné studie. Diplomátka se zapojila do přípravy rekombinantní CD69 molekuly. Vybrala vhodný bakteriální kmen pro expresi dříve připraveného plazmidu dh691, nesoucího gen pro CD69 fragment s histidinovou kotvou a po transformaci izolovala afinitní chromatografií fragment dhCD69I. Problém odštěpení histidinové kotvy, které se optimálně nezdařilo trypsinem ani enterokinasou byl řešen přípravou nového plazmidu dhCD69tr. Ten umožnil vznik molekuly se záměnou 5 AMK, obsahující další místo pro štěpení trypsinem. Nový plazmid byl vytvořen vnesením sekvence CD69 s předřazeným XhoI restrikčním místem do místa do vektoru pRSET B, které obsahuje kodon pro basicou AMK arginin. Technikou PCR fragment DNA byl zmnožen, následně charakterizován, izolován a vnesen do vybraného bakteriálního expresního kmene. V tomto případě byla histidinová kotva účinkem trypsinem odštěpena a oddělena na koloně MONO Q. Získaný monomer byl dimerizován a jsou dokumentovány pokusy o jejich separaci pomocí RP-HPLC i následná analýza získaného dhCD69tr hmotnostní spektrometrií.

Práce je uvedena literárním přehledem, který je přehledně zpracován a vhodně dokumentován obrázky a tabulkami. Metodický přístup řešení problému zahrnuje širokou škálu metod genetických a metod proteinové chemie, spojených s přípravou rekombinantních bílkovin a jejich štěpení, které studentka musela v průběhu práce zvládnout. Z výsledkové části velmi oceňuji přípravu nového konstruktu dhCD69tr. Domnívám se, že právě princip a metoda jeho přípravy by měly být podrobněji popsány a zdůrazněny. Doporučuji zaměřit se na tuto část při obhajobě práce. Část Diskuse pak seznamuje s řadou informací, které doplňují i výsledkovou část a cenná je i příloha, která napomáhá orientaci v problematice.

Závěrem lze shrnout, že diplomová práce Ivany Borovičkové přináší nové původní výsledky, je pečlivě sepsána a dokumentuje vynikající odborné kvality studentky.

V Praze dne 14.5.2007

Doc. RNDr. Ludmila Tučková, DrSc
MBÚ AV ČR
Videňská 1083, 142 20 Praha 4