



Prof. RNDr. Karel Bezouška DSc.
Katedra biochemie
Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta
Hlavova 8
12840 Praha 2

Tel. +2-2195-1272 Fax.+2-2195-2331
E-mail: bezouska@biomed.cas.cz

Posudek školitele na diplomovou práci Daniela Rozbeského nazvanou „Rekombinantní exprese a studium receptorů mNKR-P1A a mNKR-P1C“

Diplomová práce Daniela Rozbeského se zabývá velmi aktuální problematikou současného imunologického výzkumu, totiž produkcí rozpustné formy membránového receptoru přirozených zabíječských buněk a hledáním sacharidových ligandů pro tento receptor. Prestože jsou myši NKR-P1 receptory známe již řadu let, výzkum biochemických, strukturních a vazebných vlastností těchto receptorů pokročil jen velmi málo. V loňském roce byly proto v naší laboratoři studenty bakalářského studia amplifikovány z myších slezin jednotlivé formy těchto receptorů, a receptory mNKR-P1A a mNKR-P1C, jejichž cDNA klony byly tímto způsobem získány, se potom staly předmětem studia předkládané diplomové práce. Jejím cílem tedy byla exprese rekombinantních rozpustných forem obou receptorů, optimalizace *in vitro* refoldingu, studium stability a základních molekulárních vlastností receptoru včetně rozřešení jeho trojrozměrné struktury, a posléze identifikace sacharidových ligandů pro oba studované receptory.

Na zadaných úkolech pracoval Daniel Rozbeský soustavně, svědomitě, a s obdivuhodným experimentálním nasazením. V práci bylo získáno mimořádně vysoké množství velmi hodnotných výsledků, ať již jde o optimalizace produkce studovaného proteinu na bohatém i minerálním médiu, zvládnutí jeho *in vitro* poskládání včetně důkazu pro správné poskládání pomocí spektroskopie NMR, dále detailní molekulární charakterizace receptoru pomocí hmotnostní spektrometrie, Ramanovy spektroskopie, dynamického rozptylu světla, a sedimentačních studií v analytické ultracentrifuze. Vysoká kvalita získaného proteinu umožnila jeho krystalizaci, a posléze i rozřešení úplné trojrozměrné struktury difrakcí rentgenovských paprsků na získaných krystalech. Rozřešená struktura je v rámci rodiny studovaných receptorů unikátní, kromě standardního proteinového modulu lektinů C-typu obsahuje ve své ligand vazající doméně dvě rozsáhlé proteinové chlopně, které aktivně participují na vazbě ligandu a jsou zdrojem unikátní vazebné specifity tohoto receptoru. Detailní vazebné a inhibiční studie pak umožnily charakterizovat specifitu tohoto lektinového receptoru vůči sacharidovým ligandům.

Na základě získaných výsledků sepsal Daniel Rozbeský předkládanou diplomovou práci, která je svým rozsahem bohatě dokumentovaná, a velmi bohatá též z hlediska myšlenkového i výsledkového. Literární úvod, který je psán velmi srozumitelně a čtivě, je ilustrován řadou pekných obrázků, a přitom zahrnuje řadu nejnovějších poznatků z oboru. Metodická část je vyčerpávající, a umožňuje pochopit a reprodukovat prováděné laboratorní postupy. Výsledková část je velmi detailní, a každý výsledek je podrobně popsán. Diskuse je věcná a střizlivá, správně interpretuje získané výsledky. Vzhledem k výše uvedeným okolnostem se domnívám, že diplomová práce Daniela Rozbeského splňuje veškeré požadavky kladené na diplomové práce na katedře biochemie PŘFUK, a doporučuji ji proto k obhajobě. Množstvím získaných výsledků tato práce spíše připomíná práci doktorskou, o čemž svědčí mj. i to, že na jejím základě jsou nyní intenzivně připravovány tři publikace.

Praha, 29.4.2009

Prof. RNDr. Karel Bezouška DSc.