



**Sektor imunologie a gnotobiologie**

*Ved.: prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.*

*Vídeňská 1083*

*142 20 Praha 4*

## **Hodnocení oponenta diplomové práce Petry Němcové “ Rekombinantní exprese a studium receptoru rNKR-P1“**

Diplomová práce Petry Němcové vznikala pod odborným vedením Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DrSc. na obou jeho domovských pracovištích, na katedře biochemie PFF UK a v Laboratoři architektury proteinů v MBÚ AV ČR. Pracovní skupina Prof. Bezoušky se dlouhodobě a na vysoké odborné úrovni věnuje studiu významné populace buněk imunitního systému, přirozeným zabijáckým buňkám (NK). NK buňky se podílí především na obraně organismů proti virům a nádorům a představují jeden ze styčných bodů mezi přirozenou a adaptivní složkou imunitního systému. Cílem skupiny je studium syntetických i přirozených ligandů receptorů NK buněk po jejichž vazbě dojde k aktivaci buněk a jejich zapojení do obranných mechanismů.

Diplomantka se aktivně zúčastnila studia vazebných receptorů NK buněk lektinové povahy a to receptorové molekuly rNKR-P1 (NK buněk potkana). Jejím úkolem bylo připravit dostatečné množství rozpustné formy tohoto receptoru pro charakterizaci struktury a pro následné vazebné studie sacharidových ligandů. Podařilo se jí porovnat a optimalizovat přípravu expresního vektoru kódujícího část extracelulární domény molekuly rNKR-P1 v oblasti aminokyselin Ala<sub>90</sub> a Lys<sub>215</sub>. Ověřila připravený vektor DNA sekvenováním a připravila rekombinantní protein, který byl produkován ve formě inkluzních tělísek. Úspěšně provedla solubilizaci, renaturaci a izolaci rozpustné formy rekombinantního proteinu. Ověření identity proteinu probíhalo ve spolupráci s pracovníky laboratoře hmotnostní spektrometrie. Byla stanovena molekulová hmotnost, která byla potvrzena analytickou ultracentrifugací. Měření dynamického rozptylu světla ukázalo, že izolovaná receptorová molekula byla získána převážně ve formě monomeru. Spolupráce se členy katedry, zejména RNDr. Kateřinou Hofbauerovou, PhD, pak směřovala k získání základních dat o sekundární struktuře molekuly, o jejíž přípravu v krystalické formě laboratoř velmi usiluje. Práce diplomantky pokračovala rozsáhlými vazebnými studii, jak metodou inhibice, tak přímé vazby na imobilizované sacharidové ligandy. Autorka testovala vazbu monosacharidů (vazba N-acetyl hexosaminu a L-Fuc), neutrálních lineárních homooligomerních sacharidů (chitobiosa až chitotetraosa), neutrálních lineárních heterooligomerů, dále vazbu neutrálních větvených jednoduchých sacharidů (slabá afinitou) a větvených komplexních sacharidů a s vysokou afinitou se vázajících nabitých sacharidů se zastoupením kyseliny sialové. Některé výsledky potvrzovaly vazebnou specifitu na obdobných konstruktech, ale byla získána i řada původních nových dat.

Při čtení práce jsem se ptala, proč nebyla pro izolaci využita běžně užívaná metoda afinitní chromatografie a příslušný konstrukt neobsahoval motiv např. pro His oblast. Izolace zahrnovala klasické metody ionexové chromatografie a gelové filtrace. V diskusi jsem se dozvěděla, že byly použity oba postupy a v prvním případě, že byla neúspěšná metoda renaturace. Není jasné, zda autorka sama testovala oba postupy, pokud tomu tak bylo, možná by bylo dobré oba dokumentovat a pokusit se vysvětlit tento rozdíl ve vlastnostech obou konstruktů. U vazebných studií, které jsou opravdu rozsáhlé, bych uvítala v rámci obhajoby menší skromnost autorky a zvýraznění původních výsledků a komentář zvýrazňující nejvíce vazebné struktury a porovnávající vazebnou afinitu dimerních receptorových molekul s připravenou monomerní formou receptoru .

Předložená diplomová práce je psaná jasně, přehledně a čtivě. Literární úvod dokumentuje znalost literatury v oboru (pouze bych uvítala náčrt struktury NK receptorů). Metodická část ukazuje úctyhodnou šíři moderních metod molekulární biologie, biochemie a imunologie, které diplomantka zvládla a se kterými se podrobně seznámila. Výsledková část je přehledně členěna a dokumentována řadou tabulek a grafů. Diskuse s nadhledem a skromností hodnotí získané výsledky v kontextu se současným pokrokem v oboru. Celá práce jasně ukazuje schopnosti diplomantky studovat literaturu, zvládat nové metody, získat významné výsledky a provést jejich zpracování a zhodnocení.

Lze shrnout, že diplomová práce Petry Němcové je velmi kvalitní, splňuje veškeré požadavky kladené na diplomové práce, a proto ji hodnotím velmi kladně a doporučuji k obhajobě.

V Praze 16.5. 2009

---

Doc. RNDr Ludmila Tučková, DrSc.