

## Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor práce: **Pavel Hanč**

Název práce: *Výzkum vzájemné interakce membránových receptorů NKR-P1D a Clrb*

Jméno školitele: RNDr. **Petr Novák**, Ph.D.

Jméno oponenta: Mgr. **Tomáš Brdička**, Ph.D.

Cílem diplomové práce Pavla Hanče byla biochemická a strukturní analýza interakce membránového NK receptoru NKR-P1D a jeho ligandu, transmembránového proteinu Clrb in vitro. Tento protein byl mezi prvními identifikovatelnými MHC I nepříbuznými ligandy inhibičních NK receptorů. Rozšířil tak spektrum tzv. „missing self“ na které se NK buňky zaměřují a podpořil hypotézy, že interakce NK buněk s ligandy nepříbuznými MHCgpI pomáhají udržovat NK buněčnou toleranci k vlastnímu organismu. Ne všechny skupiny zabývající se interakcí mezi NKR-P1D a Clrb však dospěly ke stejným závěrům o jejím významu pro inhibici NK buněčné cytotoxicity. Tato diplomová práce velmi podrobným způsobem charakterizuje interakci uvedených proteinů a domnívám se, že tím významně přispívá do diskuse na toto téma.

V úvodu své práce Pavel Hanč podává vyčerpávající přehled literatury od počátků imunologie až po podrobnosti regulace aktivity NK buněk. I přes svůj rozsah však přehled literatury působí vyváženým dojmem, většina informací má přímý vztah k problémům řešeným ve výsledkové části a celkově je velmi kvalitně zpracován. Výsledková část se pak věnuje konkrétním experimentům s cílem podrobně na všech úrovních charakterizovat interakci NKR-P1D a Clrb in vitro. Metodicky přitom pokrývá celý proces od přípravy konstruktů přes produkci rekombinantních proteinů, jejich renaturaci, kontrolu kvality až po biofyzikální charakterizaci jejich interakcí a získání strukturních dat pomocí chemického zesíťování spojeného s analýzou pomocí hmotové spektrometrie. Výsledkem je pak přibližné určení afinity a vytvoření strukturního modelu interakce mezi dimery NKR-P1D a Clrb. Získaná data vedla i k formulaci nové a atraktivní hypotézy o orientaci těchto interakčních partnerů za vzniku oligomerů, což by mohlo mít zajímavý vliv i na mechanismy signální transdukce těmito receptory. Také po formální stránce je práce kvalitně zpracována a napsána s minimem chyb.

K této práci nemám téměř žádnou kritiku. Zmínil bych jen dva nepříliš závažné nedostatky.

- 1) Na str. 30 je napsáno, že fosfatasa SHIP defosforyluje fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát na fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát. Ve skutečnosti je ovšem produktem reakce fosfatidyl inositol-3,4-bisfosfát, což může mít významné funkční důsledky, protože některé PH domény jsou schopny rozeznávat i tento lipid. Je známa specifita PH domén kinas rodiny Tec, které zmiňujete vzápětí? Je možné, že některé z nich váží i fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát?
- 2) Myslím, že by bylo užitečné v práci podrobněji diskutovat výsledky experimentu se síťovacími činidly, zejména to, která konkrétně pozorovaná zesíťování jsou v souladu s první nebo druhou orientací zúčastněných proteinů, případně, která nejsou v souladu s žádnou diskutovanou orientací. Čtenář by si tak mohl udělat přesnější představu o kvalitě navrženého modelu. Ze stejného důvodu by bylo vhodné diskutovat i případná intramolekulární zesíťování, pokud byla nějaká pozorována.

Tyto nedostatky však zásadně neovlivňují význam ani kvalitu předložené práce. Pavel Hanč touto prací prokázal značnou metodickou vybavenost, schopnost analýzy komplexních experimentálních dat i schopnost samostatné práce s vědeckou literaturou.

**Jako taková práce jednoznačně splňuje požadavky na diplomovou práci a doporučuji ji ke kladnému přijetí.**

Závěrem ještě několik dotazů do diskuse:

- 1) Na obrázku 44 (str. 91), který ukazuje SDS-PAGE gely proteinů po chemickém zesílení jsou v oblasti okol 15 kDa dva proužky zřejmě odpovídající rekombinantním NKR-P1D a Clrb, horní proužek však po síťovací reakci v některých případech zmizí. Podobný jev je patrný i na obrázku 45. Máte pro to nějaké vysvětlení?
- 2) Byla pozorována i intramolekulární zesílení? Byla v souladu s modely struktury obou proteinů?
- 3) Je známo, jestli jsou NKR-P1D nebo Clrb glykosylované. Je možné že interakce lektinových domén se sacharidy, které nemohly být pozorovány na bakteriálních proteinech přispívají k afinitě/aviditě interakce?

V Praze 26.5.2011

Tomáš Brdička