

Posudek školitele na diplomovou práci „Příprava rekombinantních forem extracelulární domény myších leukocytárních receptorů z rodiny NKR-P1“ vypracovanou Davidem Adámkem

Předkládaná diplomová práce pojednává o přípravě rekombinantních forem NK buněčných lektinových receptorů NKR-P1A a C. Přesněji šlo o formy těchto receptorů obsahující kromě C-lektinové domény i tzv. krček – oblast, která u daných molekul bývá zodpovědná za tvorbu kovalentních dimerů spojených disulfidovým můstkem. Práce měla rozšiřovat výsledky, kterých naše laboratoř dosáhla při studiu struktury solubilní formy NKR-P1A obsahující pouze lektinovou doménu. Jelikož bývají receptory NKR-P1 na povrchu buněk popisovány v literatuře jako disulfidicky svázané dimery a zároveň nejsou dosud známé ligandy dvou izoform NKR-P1, bylo cílem této práce nalézt vhodné podmínky pro expresi, purifikaci a renaturaci celých extracelulárních částí receptorů NKR-P1A a C. Tyto proteiny by měly být následně využity pro hledání ligandů a strukturní studie.

Davidova práce započala izolací a amplifikací části genu kódující extracelulární části obou receptorů. Za zmínku stojí zejména fakt, že se Davidovi v tomto kroku podařilo kromě očekávaných sekvencí získat i variantu formy C, které chybí cystein považovaný za dimerizační (respektive zde chybí úsek tří aminokyselin, mezi nimiž je i daný cystein). S přihlédnutím k popisovanému dimernímu charakteru receptorů NKR-P1 rodiny, tak tato varianta poskytuje velmi zajímavý námět pro rozšíření původního experimentálního plánu. Z Davidova pohledu toto však znamenalo pracovat se třemi, nikoliv s původně plánovanými dvěma proteiny, čehož se ale ujal velmi ochotně a zodpovědně. Další Davidovy experimentální kroky zahrnovaly velkou řadu optimalizací. Zejména bylo třeba se vypořádat s problémem dimerizace proteinů, což při refoldingu rozpustných proteinů v roztoku je velmi nelehký úkol. Výsledkem bylo získání dimerní formy receptoru NKR-P1C (izotypu 1). Zajímavé je, že formy se sudým počtem cysteinů (NKR-P1A a C2) tvořily pouze monomery. Proteiny připravené Davidem se ukázaly jako velmi homogenní a stabilní a lze tudíž předpokládat, že jsou i správně renaturované. Velmi povzbudivé jsou pak předběžné výsledky hledání ligandů s fluorescenčně značenými proteiny získané Davidem pod vedením doc. Černého. Spolupráce s Davidem byla velmi příjemná a bezproblémová. Davida považuji za velmi svědomitého experimentátora, který byl vždy perfektně připraven a přesně splnil uložené úkoly a to i v daném časovém horizontu. Specifickou Davidovou vlastností je záliba v utváření téměř dokonalé grafické koncepce a prezentace výsledků. Výsledkem této snahy je, že David dokáže své výsledky prezentovat ucelenou a velmi srozumitelnou formou.

Díky svým pracovním schopnostem i lidským vlastnostem, se David během svého působení v naší laboratoři stal nedílnou součástí týmu a jsme proto velmi rádi, že se rozhodl s námi dále setrvat jako student doktorského programu.

S ohledem na výše uvedená fakta jsem přesvědčen, že diplomová práce Davida Adámka splňuje požadavky kladené na diplomové práce na katedře buněčné biologie PŘF UK, a doporučuji ji k obhajobě se známkou „výborně“.

V Praze, dne 28. května 2012

Petr Man

