

Oponentský posudek diplomové práce

Autor práce: **Bc. David Adámek**

Název práce: ***Příprava rekombinantních forem extracelulární domény myších leukocytárních receptorů z rodiny NKR-P1***

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

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

Cílem diplomové práce Davida Adámka byla optimalizace produkce, purifikace a renaturace extracelulárních částí rekombinantních receptorů myších NK buněk mNKR-P1A a mNKR-P1C.

V úvodu své práce David Adámek podává přehled literatury zaměřený zejména na funkci a biologii NK buněk a NK buněčných receptorů. Obsahuje veškeré informace potřebné ke zhodnocení experimentální části práce i jejího zasazení do správného kontextu a celkově je až na několik relativně málo významných nedostatků dobře a čtivě napsán. Mezi tyto nedostatky patří např. určitá nepřehlednost v používání některých specifických pojmů, se kterými se v textu operuje dříve, než jsou řádně vysvětleny (co jsou to aktivační a inhibiční receptory NK buněk je vysvětleno až na str. 13, zatímco poprvé je tento pojem použit už na str. 10, pojem ITIM je zmíněn na str. 13, ale vysvětlen až na str. 18, nebo v češtině poněkud neobvyklé dělení subpopulací NK buněk z hlediska exprese antigenů na „tmavé“ a „světlé“ je používáno od str. 12, vysvětleno až na str. 15). Také se domnívám, že je až příliš mnoho prostoru věnováno kapitolám někdy až učebnicového charakteru zaměřeným na obecné funkce imunitního systému, na vývoj NK buněk, dělení na různé subpopulace a jejich popis, zatímco těžiště literárního přehledu by mělo spíše být v detailním rozboru funkce NK receptorů, zejména pak z rodiny NKR-P1 jejichž příprava je základem výsledkové části. Kapitoly zaměřené na tuto problematiku v literárním přehledu samozřejmě nechybí, avšak některá témata by si, dle mého názoru, zasloužila více pozornosti. Rozsáhlejší by mohly být zejména odstavce pojednávající o signálních drahách aktivovaných NK receptory nebo popis fyziologických funkcí jednotlivých NK receptorů, který je někdy až příliš strohý a nedostatečně zařazený do kontextu.

Kapitola „Metody“ je zpracována velmi dobře a podrobně. Ukazuje, že autor zvládnul značné množství biochemických a molekulárně biologických postupů a svědčí i o velmi dobrém pochopení principů používaných metod.

Výsledková část se pak věnuje konkrétním experimentům s cílem připravit velké množství kvalitních a správně renaturovaných proteinů a pokrývá celý proces od přípravy konstruktů přes produkci rekombinantních proteinů, jejich renaturaci, kontrolu kvality až po fluorescenční značení a předběžné experimenty zaměřené na identifikaci zatím neznámého ligandu těchto receptorů. Získané výsledky jsou vysoké kvality a jednoznačně potvrzují značnou metodickou vybavenost autora i schopnost analýzy komplexních experimentálních dat. Zároveň dokumentují, že cílů práce bylo v plné míře dosaženo. Na druhou stranu je ale také třeba říci, že i výsledková část trpí na některých místech určitou nepřehledností díky vynechání popisu některých důležitých kroků pracovního postupu, které jsou zmíněny pouze v kapitole „Metody“ a kapitola „Výsledky“ na ně mnohdy ani neodkazuje. To do jisté míry

ztěžuje pochopení logiky a návaznosti jednotlivých kroků. Diskuse je však již napsána přehledně a svědčí o velmi dobré orientaci autora v řešené problematice.

Závěrem bych chtěl zdůraznit, že všechny výše zmíněné nedostatky tohoto spisu jsou spíše formálního charakteru a zásadně neovlivňují význam ani experimentální kvalitu předložené práce. David Adámek v této práci prokázal experimentální zdatnost, schopnost analýzy získaných dat včetně jejich diskuse v kontextu současných znalostí a velmi dobrou orientaci v literatuře.

Práce splňuje požadavky na diplomovou práci a doporučuji ji ke kladnému přijetí.

Závěrem ještě připomínky a dotazy do diskuse:

- 1) Na str. 8 chybně píšete, že makrofágy jsou tkáňovou formou neutrofilů. Mohl byste to uvést na pravou míru?
- 2) Je známo, jestli jsou NKR-P1A a NKR-P1C glykosylované? Je možné, že by případná glykosylace mohla ovlivnit interakci s hledaným ligandem? Jaký by byl možný postup přípravy plně glykosylovaného rekombinantního proteinu? Byl by takový protein vhodný ke krystalizaci?
- 3) Existují myši postrádající expresi členů rodiny NKR-P1? Jaký je jejich fenotyp? Jsou známy mutace ovlivňující funkci NKR-P1 u lidí?



Tomáš Brdička

V Praze 11.6.2012