



Sektor imunologie a gnotobiologie

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

Videňská 1083

142 20 Praha 4

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Daniela Kavana “ Studium receptorů NK buněk a jiných proteinů pomocí rekombinantní exprese a hmotnostní spektrometrie“

Doktorskou disertační práci vypracoval Mgr. D. Kavan v letech 2003-2010 na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty University Karlovy v Praze pod vedení školitele Prof.RNDr. Karla Bezoušky, DSc., který současně vede laboratoř Struktury bílkovin na Sektoru Imunologie Mikrobiologického ústavu v.v.i. AVČR. Předložená práce odráží interdisciplinární charakter pracoviště a představuje zapojení biochemických a chemických přístupů do studia receptorových molekul přítomných na přirozených zabijčeských buňkách (NK), které jsou významnou součástí imunitních mechanismů účastnících se především v obraně proti virům a nádorům.

Toto pracoviště se dlouhodobě věnuje studiu receptorových molekul a vazebných ligandů u funkčně heterogenní populace NK buněk a představuje jednu z předních laboratoří v tomto oboru. Práce má dvě základní části, první je věnována přípravě a charakterizaci molekuly CD69, která je přítomna na řadě buněčných populací včetně NK buněk a jeho množství na buněčném povrchu narůstá po stimulaci buněk, je znakem aktivovaných lymfocytů. Na základě struktury se tato molekuly řadí do rodiny C-typu lektinů. Druhá část je metodicky zaměřená a zahrnuje metodické přístupy a zpracování dat z hmotností spektrometrie.

Autor předkládá soubor sedmi prací, publikovaných v renomovaných mezinárodních odborných časopisech. Na jedné publikaci je prvním autorem a na dalších (s výjimkou jedné) druhým nebo třetím autorem, což jasně dokumentuje jeho významný podíl na všech předkládaných publikacích. Vzhledem ke svému profesnímu zaměření se více soustředím na imunologii blízkou tematiku, molekulu CD69 receptoru. D. Kavan se zapojil do přípravy stabilních rozpustných forem CD69 molekuly a do studia vazby vápníku a sacharidů u různých forem receptorové molekuly v roztoku a na buněčném povrchu. Zatímco se vazba vápníku nelišila u monomerní a dimerní

formy, kovalentně nebo nekovalentně vázané, vazba hexosaminů výrazně závisela na použité formě CD69 molekuly. Vazba na dimerní lidský CD69, sledovaná rovnovážnou dialýzou, fluorescentní titrací i NMR, jasně ukázala účast obou podjednotek na vysokoafinitní vazbě N-acetyl –glukosaminu, kontrolní N-acetyl-manosamin se nevázal. Přitom žádný z použitých hexosaminů nevyvolal po vazbě změnu konformace receptorové molekuly (zachován retenční čas, sedimentační koeficient). Vazba monomerní CD69 byla o 1-2 řády nižší, v závislosti na použitém konstruktu. Dále se podařilo optimalizovat přípravu konstruktů rozpustné formy CD69 stabilní v kyselém pH a při teplotě do 65°C, který krystalizuje a váže studovaný ligand. Významné je, že tato forma molekuly je stabilní i *in vivo*. V krevním oběhu experimentální myši lze prokázat více než 70% intaktního proteinu 24 hod po i.v. podání, zatímco méně stabilní formy jsou rychle zachytávány v játrech.

Po přečtení práce mám na autora několik dotazů :

1. Je znám vazebný partner CD69 na NK nebo jeho jiná přirozená vazebná molekula na buňkách s expresí této molekuly?
2. Je receptor CD69 nacházen v membránových mikrodoménách? Pokud ano, s jakými dalšími molekulami se společně vyskytuje a na jakých buňkách?
3. U přípravy *in vivo* stabilní formy CD69 zmiňujete její možné terapeutické využití, cílené především na interakci NK – nádorová buňka. Srovnajte možný účinek solubilní formy CD69, vazebného ligandu (hexosaminů) a případné blokační monoklonální protilátky proti receptorové molekule (obdoba CD69-/-) na interakci a aktivaci těchto buněk
4. Zmiňujete také nárůst CD69 u některých onemocnění imunitního systému. Jaká je připisována úloha této molekuly v patogeneze těchto onemocnění. Byly popsány genové (bodové) mutace, polymorfismus spojený s některým onemocněním se zvýšenou expresí receptoru?

Práce je napsaná v jazyce anglickém, přehledně a čtivě. Dokumentuje jak znalost odborné literatury jak o NK buňkách, tak i opravdu úctyhodně širokou metodickou výbavu autora, zahrnující jak metody gemoniky, proteomiky i imunologických přístupů. Jeho začlenění do řady laboratoří by bylo proto jednoznačným přínosem pro pracoviště. Dále je zřejmá i jeho schopnost použít tyto metody pro získání původních výsledků a jejich kritické zhodnocení v kontextu se současnými poznatky. Vedle souboru sedmi prací jsou uvedeny u další publikace, kde je D. Kavan členem autorského týmu, a které se zabývají jak molekulou CD69 (a bylo by dobré je zmínit i tyto výsledky) tak i s další tematikou, celkem 17 publikací.

Lze shrnout, že předkládaná rigorózní práce je velmi kvalitní, dokumentuje autorův talent pro vědeckou a práci, široký záběr zvládnutých technik i značnou píli. Práce splňuje všechny požadavky kladené na doktorskou disertační práci a proto ji doporučuji k obhajobě pro získání titulu PhD.

V Praze dne 6.6. 2010

Doc. RNDr. Ludmila Tučková, DrSc.
Sektor imunologie a gnotobiologie,
Mikrobiologický ústav AVČR