

Ivany Vonkové

Biochemical and Functional Characterization of a Novel Transmembrane Adaptor Protein Nvl

Na úvod bych chtěl konstatovat, že předložená diplomová práce je psána výbornou čtivou angličtinou, bez překlepů a formálních nedostatků, celkově patří k tomu nejlepšímu, co bylo předloženo k obhájení během deseti let mé supervize magisterského studijního oboru imunologie.

V *literárním přehledu* autorka shrnuje problematiku profesionálních antigen-presentujících buněk, tetraspaninů a jejich komplexů s důrazem na strukturu a funkci jednoho zástupce – studované molekuly Nvl, signalizaci prostřednictvím molekuly MHCII, včetně buněčné polarizace a tvorby imunologické synapse. Rozsah této části diplomové práce je zcela dostatečný pro uvedení do problematiky, obsahuje ty nejnovější popř. nejvýznamnější relevantní práce, které provazuje do logického a sevrženého kontextu vystihujícího současný stav poznání vdané oblasti bádání.

Kde v buňce vznikají tetraspaninové komplexy? Jak jsou jimi mediované interakce stabilní v průběhu času? Jaký je jejich „metabolický obrat“ na buněčném povrchu? Jsou jejich komponenty z buněčného povrchu endocytovány společně, nebo zvlášť? Souvisí vzájemné asociace se „stářím“ TEMs na buněčném povrchu?

Kapitola *materiál a metody* je výborně zpracovaná, obsahuje všechny důležité informace a umožňuje reprodukování experimentů. Metodický rozsah, který si během své práce osvojila Ivana Vonková je obdivuhodný – počínaje technikami kultivace buněk včetně jejich aktivace a diferenciaci, přes klasickou proteinovou biochemii včetně imunoprecipitace a western blottingu, techniky molekulární genetiky, průtokovou cytometrii, transfekční přístupy včetně retrovirální infekce, důležitou součástí práce jsou mikroskopické zobrazovací techniky včetně studií *in vivo*.

Výsledky prokazují vědeckou kompetentnost autorky. Vše je jasně formulované a logicky uspořádané. Autorka začíná průkazem membránové lokalizace Nvl biochemickými a mikroskopickými přístupy. Dále byl charakterizován expresní profil pomocí bioinformatiky i testováním na proteinové úrovni. *Expresní profil na úrovni mRNA a proteinu se liší v případě primárních a sekundárních lymfatických orgánů – jaké je vaše vysvětlení?* Byla prokázána korelace s expresí MHC II. třídy. *Jak je tomu s expresí Nvl v tymických epiteliálních buňkách, i zde je korelace zachována?* Tato korelace byla podpořena aktivačními experimenty. Nesmírně zajímavým výsledkem je změna lokalizace Nvl během buněčné polarizace (migrace, buněčné dělení, tvorba antigenní synapse). Další část práce se věnuje biochemickému průkazu asociace s tetraspaniny, změnám fosforylace a velice pečlivé charakterizaci asociovaných molekul. Je zřejmé, že v této části autorka zařadila jen „špičku ledovce“ svých výsledků. Práce zde obsahuje m.j. sofistikované kontroly tyrosinových mutant Nvl. Od biochemie pak autorka přechází k aktivačním experimentům relevantním *in vivo*, koreluje myší model s lidským a srovnává myeloidní buňky s B-lymfocyty. „Třešničkou na dortu“ jsou experimenty využívající pro snížení exprese příslušné siRNA, které jednoznačně prokázaly negativní regulační úlohu Nvl v dendritických buňkách.

Diskuse jasně ukazuje autorčinu schopnost kriticky zhodnotit své experimentální výsledky a uvést je do kontextu s recentní literaturou. Všechny podstatné výsledky jsou zevrubně diskutovány, této části práce není co vytknout, naopak. Autorka erudovaně srovnává myší a lidský model, zaslíbeně též pracuje s daty získanými při použití různých buněčných typů. Její závěry jsou logické, při diskusi má výhodu v tom, že se snažila pracovat s relevantními buněčnými typy primárního původu, jen v opodstatněných případech s buněčnými liniemi a to za podmínek co nejvíc se blížících situaci *in vivo*.

Celkově hodnotím předloženou diplomovou práci jako mimořádně kvalitní, ukázkovou. Jedná se o další příklad skvělé práce vzešlé z laboratoře Prof. Václava Hořejšího *in extenso*, tentokrát vedené Dr. Tomášem Brdičkou, který prokázal mimořádné pedagogické nadání při vědecké výchově. Doporučuji hodnotící komisi vysoce kladné hodnocení - známku výborně. Osobně přeji autorce mnoho úspěchů ve skvěle nastartované vědecké kariéře. V případě brzké publikace předložených mimořádně kvalitních experimentálních dat bych rád práci Ivany Vonkové nominoval na některou z vypisovaných cen!

