



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KOTLÁŘSKÁ 2
61137 BRNO

IČO:00216224 DIČ:CZ00216224

DOC.RNDR. MICHAELA WIMMEROVÁ, PH.D.
ÚSTAV BIOCHEMIE & NÁRODNÍ CENTRUM
PRO VÝZKUM BIOMOLEKUL

tel.: 549498166
fax: 549492556
E-mail: michaw@chemi.muni.cz

Oponentský posudek na disertační práci **Mgr. Hynka Mrázka**
**„ α -N-Acetylgalactosaminidase as a tools in the synthesis of
complex oligosaccharide immune stimulators“**

Předložená disertační práce Mgr. Hynka Mrázka je primárně zaměřena na identifikaci, klonování, produkci a další využití α -N-acetylgalaktosaminidasy (α -NAGA) z vláknité houby *Aspergillus niger*. Práce je psaná v klasickém formátu, na 56 stranách teoretického úvodu je přehledným způsobem uvedena rešerše studované tematiky, která je zaměřena na glykoproteiny, enzymy zapojené do výstavby a hydrolyzy glykokonjugátů a význam glykosylace pro biologickou funkci. Autor také diskutuje chemickou syntézu glykanů a možnosti zapojení enzymů do syntézy *in vitro*. Teoretický úvod je dále věnován imunitnímu systému, sacharidovým epitopům a proteinům zapojených do jejich specifického rozpoznávání. Další podkapitoly jsou věnovány principům použitých metod.

Na počátku teoretické části bych uvítala alespoň krátký úvod, čeho se disertační práce bude týkat, protože jinak jednotlivé kapitoly působí nesourodě a význam jejich uvedení se čtenář dozví až z prezentovaných výsledků. I po přečtení cílů disertační práce totiž není zřejmé, proč je např. v úvodu velká část věnována buňkám imunitního systému a jeho regulaci. Jednotlivé kapitoly však jsou velmi dobře napsány, umožňující čtenáři velmi hladké proniknutí do představované problematiky.

Praktická část je uvedena krátkou metodickou částí, popisující dostatečně vlastní provedení experimentů, následovanou výsledkovou částí. Tady je zřejmé, že většina uvedených dat již prošla recenzovaným řízením a jsou i součástí publikací zařazených v přílohách.

Lze konstatovat, že Mgr. Hynek Mrázek odvedl velký kus práce a musím říci, že doktorand velmi přímočaře a lakonicky shrnul mnohé pokusy s různými expresními systémy. Jako člověk mající zkušenosti v této oblasti musím vyzdvihnout enormní množství práce, které se následně schová do několika málo stránek, což mnohdy lidem nepracujícím v této oblasti uniká a klonování a produkce rekombinantních proteinů se následně zdá jako jednoduchá záležitost. Každopádně se doktorandovi podařilo úspěšně tento krok splnit, což umožnilo enzym dále charakterizovat a výsledky jsou nyní pod patentovou ochranou. Část výsledků je dále věnována receptorům „zabíječských“ buněk imunitního systému (NK receptorům), a to jak významu jejich dimerizace tak účinků syntetických ligandů na bázi N-acetylglukosaminu na receptory. Tady mi asi nejvíce chybí návaznost na velmi úzce formulované cíle disertační práce, které jsou striktně zaměřeny pouze na produkci a charakterizaci α -NAGA. Naposledy zmíněné výsledky s tematikou α -NAGA velmi úzce souvisí, ale nejsou zahrnuty do plánovaných cílů. Z tohoto pohledu se dá říci, že dosažené výsledky přesahují cíle disertační práce.

Práce je ukončena kapitolou Diskuse, která shrnuje jednotlivé prezentované výsledky. Z tohoto pohledu se jedná spíše o souhrn, u kapitoly Diskuse bych očekávala diskuzi výsledků v kontextu s literaturou. Tento nedostatek však můžeme najít splněný v jednotlivých publikovaných člancích. Obecně, práce obsahuje hodnotné výsledky a obzvláště cenné je, že se doktorand věnoval širokému spektru metod, které zcela jistě zvyšují jeho uplatnění v budoucnosti.

Práce je psána v anglickém jazyce, víceméně bez překlepů. Velmi silně je však na mnoha místech uplatňován „český“ slovosled (předmět, přísudek, podmět). Toto nedělá problém českému čtenáři, takže z mého pohledu je práce psána srozumitelně, bez nutnosti přemýšlení, co chtěl autor danou pasáží říci, ale čistě anglicky přemýšlející čtenář může občas tápat. Tato malá „výtka“ je pro budoucí texty autora. Naopak oceňuji sepsání práce v anglickém jazyce a dokážu si představit časový tlak při sepisování práce, který neumožnil vychytní těchto maličkostí.

K práci mám několik námětů do diskuse:

Na obr. 15 – byla aktivita enzymu normalizována na množství proteinu produkovaného expresními buňkami? Čím si doktorand vysvětluje její pokles po 72 hod po indukci exprese genu?

Dá se nějak vysvětlit pH optimum enzymu ve velmi kyselé oblasti?

Na pozadí svých zkušeností, jak vidí doktorand budoucnost syntéz komplexních oligosacharidů, eventuelně glykosylace peptidů, proteinů apod. Kudy povede cesta, spíše automatizací procesů, kde se nachází sofistikovaná „lidská“ syntéza?

Doktorand je autorem či spoluautorem pěti publikací, disertační práce je postavena na 4 publikacích (jedenkrát jako první autor) a jednom prvoautorském patentu, což zcela jistě dává hodnotný základ pro úspěšnou obhajobu disertační práce. Hynek Mrázek prokázal, že je schopen samostatné vědecké práce, a to nejen v úzce zaměřené oblasti vědy. Jelikož jsou vznesené připomínky spíše formálního charakteru, které doprovází každý rozsáhlejší spis, i na základě výše uvedeného, doporučuji disertační práci k obhajobě a aby byl, po absolvování úspěšné obhajoby, Mgr. Hynku Mrázkovi udělen titul Ph.D.

V Brně 1.9.2011

Doc. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.