

Oponentský posudek doktorské dizertační práce Mgr. Ondřeje Balleka nazvané „Spatiotemporal regulation of Lck activity in the initiation of TCR signalling“.

Dizertační práce Mgr. Ondřeje Balleka byla vypracována pod odborným vedením RNDr. Dominika Filippa, PhD. v Laboratoři imunobiologie Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze. Dizertační práce je prezentována ve zkrácené verzi a je koncipována jako soubor čtyř publikovaných článků, které jsou doplněny o obecný úvod. Z hlediska autorství vědeckých článků se jedná o tři prvoautorské původní články (*Frontiers in Immunology*, *Immunology letters*, *Immunology and Cell Biology*) a jedna souhrnná publikace s autorstvím na druhém místě (*Frontiers in Immunology*). Mgr. Ballek se také podílel a je uveden jako spoluautor na dalších třech článcích, které nemají přímý vztah k problematice dizertační práce.

Těžištěm celé dizertační práce je objasnění dynamiky aktivace nереceptorové tyrosinové proteinkinázy Lck a její translokace do lipidových mikrodomén v průběhu aktivace T-buněk. Autor prokázal, že Lck je v naivních T-buňkách přítomna v preaktivovaném stavu společně s proteinfosfatázou CD45, a po aktivaci buněk povrchovým receptorem T buněk dochází k translokaci Lck do specifických „lehkých“ lipidových kompartmentů v buněčné membráně. Zastoupení preaktivované Lck je však relativně malé a po aktivaci T-buněk dochází výraznému nárůstu její aktivity. Dále autor identifikoval tzv. „scaffold“ protein RACK1 jako interakční partner Lck a ukázal, že SH2, SH3 a C-terminální domény Lck jsou nezbytné pro efektivní asociaci Lck s RACK1. Vazba však není přímá a pravděpodobně se na ní podílí protein α -actinin-1. Dále bylo prokázáno, že RACK1 a Lck jsou společně distribuovány do tvořící se imunologické synapse. Na základě dosažených výsledků pak autor navrhuje nový model časné regulace aktivace T-buněk založené na dynamické regulaci prostorově segregovaných lipidových mikrodomén pomocí kritických signalizačních proteinů.

Předkládaná dizertační práce je psána v anglickém jazyce a je členěna na kapitoly *Abstract*, *Literature overview*, *Thesis aims*, *Results* (která obsahuje kopie autorových publikací) and *General conclusions and discussion*. Závěrečná část pak obsahuje přehled literatury. Po jazykové stránce je dizertační práce jako celek nadstandardně zpracována a v textu je minimální množství překlepů a ojedinělé stylistické neobratnosti (např. „integrines“ na straně 27, „ α -actinine-1“ na straně 61, „*Three signalling modules can be distinguish:*“ v legendě k obr. 2, „*RACK1 acts as an inhibitor of Src activity, cell grown and tumorigenesis ...*“ na straně 33“). Kromě formální stránky je práce pečlivě zpracována i z hlediska srozumitelnosti textu a čtivosti, čemuž pomáhá i vhodné doplnění schematickými obrázky, které umožňují snadnou orientaci v textu.

Protože jsou výsledky prezentovány ve formě publikovaných rukopisů a tudíž prošly recenzním řízením, mám pocit, že je poměrně zbytečné hledat potenciální

nedostatky v experimentálních postupech nebo v interpretaci získaných výsledků. Mé dotazy jsou tedy, až na jednu výjimku, obecnější povahy:

1. První otázka se týká translokace RACK1 do nově se tvořící imunologické synapse. Imunologická synapse obsahuje integrinové receptory a také bylo popsáno, že integriny mohou po stimulaci buněk asociovat s RACK1. Chtěl bych se zeptat, zdali je možné, že je translokace RACK1 do imunologické synapse závislá na integrinových receptorech? V obecnější podobě, je známá dynamika translokace integrinů do imunologické synapse?
2. Poměrně překvapivě jsem v textu nenašel údaj o velikosti imunologické synapse. Jaké jsou její rozměry? S tím souvisí i otázka na dynamiku aktinového cytoskeletu v imunologické synapsi. Vzhledem k tomu, že se RACK1 i α -actinin podílejí na regulaci aktinového cytoskeletu (a pravděpodobně i na regulaci mikrotubulů), tak by tyto proteiny mohly ovlivnit i dynamiku vzniku imunologické synapse.
3. Poslední otázka je technické povahy a týká se RACK1 publikace, kde se v experimentech popisující translokaci Lck v reálném čase používá konstrukt CFP-Lck. Lze předpokládat, že fluorofor CFP je umístěn na C-terminálním konci Lck, nicméně tatko umístěný fluorofor může rozvolnit autoinhibici a způsobit spontánní aktivaci Lck (např. Sandilands et al., Dev Cell 2004). Bylo ověřeno, zdali ke spontánní aktivaci Lck nedochází?

Závěrem bych zdůraznil, že považuji metodickou, odbornou a formální úroveň předložené práce za vynikající. Tato práce přináší nové poznatky, které podstatným způsobem rozšiřují naše znalosti týkající se signalizace buněk imunitního systému. Z pohledu oponenta považuji za zásadní fakt, že výsledky této disertační práce tvoří součást řady původních prací publikovaných v respektovaných odborných časopisech. Na základě kvality disertační práce Mgr. Ondřeje Balleka doporučuji, aby tato práce byla přijata pro řízení o udělení vědecké hodnosti *Philosophiae doctor*.

V Praze 7. 6. 2017

Tomáš Vomastek

Mikrobiologický ústav AV ČR
Vídeňská 1083
Praha-4