

Cyril Bařinka, PhD
Laboratoř strukturní biologie
Vıdeňská 1083
142 00 Praha 4
Česká republika

Tel: +420-296-443-615
E-mail: barinka@img.cas.cz

21.10. 2010

Oponentský posudek

Structure and function of C-type lectin NK cell receptors studied by recombinant expression and protein crystallography

Doktorská dizertační práce

Mgr. Ondřej Vaněk

Předkládaná dizertační práce byla vypracována na katedře biochemie PŘF UK v Praze, pod odborným vedením Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. Práce je vyhotovena ve formě souhrnu v členění úvod-cíle-metodiky-výsledky-diskuze a závěr a je doplněna šesti příloženými publikacemi. Čtyři z těchto publikací jsou ve formátu článků přijatých do recenzovaných časopisů, dvě jako rukopisy odeslané k recenznímu řízení.

Hlavní náplní předkládané dizertační práce je vývoj metodik a systémů vhodných k heterologní produkci lektinových receptorů typu C, které jsou fyziologicky exprimovány na povrchu NK buněk, a jejich následná detailní charakterizace. Studiu receptorů NK buněk je v laboratoři prof. Bezoušky věnována dlouhodobá pozornost a troufám si tvrdit, že výsledky předkládané práce posunuly tento výzkum o notný kus dopředu. Kandidát v předkládané práci dokazuje, že si osvojil širokou škálu molekulárně-biologických a fyzikálně-chemických technik zahrnující klonování, heterologní expresi a purifikaci rekombinantních proteinů a jejich následnou charakterizaci, ať už metodami analytické ultracentrifugace nebo rentgenostrukturní analýzou. Naprosto zásadní význam má z mého pohledu implementace nových technik heterologní exprese do portfolia laboratoře, kterou kandidát zvládl na výbornou. Tento, časově náročný a velmi často nedoceněný, příspěvek bude v laboratoři určitě hojně využíván následujícími generacemi studentů a usnadní a zefektivní práci na dalších projektech. Unikátním výsledkem je rovněž vyřešení první krystalové struktury myšního receptoru

z rodiny NKR-P1 a tato data budou bezesporu klíčová pro další studium zmíněné rodiny receptorů, včetně predikce a analýzy interakcí receptor-ligand.

Z bibliografie je zřejmé, že kandidát je prvním autorem dvou publikací a spoluautorem dalších pěti publikací. Šest z těchto publikací je dostupných v databázových systémech (např. Pubmed), sedmá je pak uvedena s dodatkem „v tisku“. V této souvislosti by možná bylo vhodné (minimálně za účelem oponentského řízení) k dizertaci přiložit i poslední zmíněnou publikaci, kde je kandidát prvním autorem. Rovněž bych u každé přiložené publikace, kde kandidát není prvním autorem, ocenil kratičkou poznámkou vymezující příspěvek kandidáta k jednotlivým publikacím.

Je chvályhodné, že se kandidát rozhodl psát dizertaci v anglickém jazyce, protože tuto zkušenost zcela určitě využije v další vědecké kariéře. Jazyková i grafická stránka jsou na vysoké úrovni s minimem věcných a formálních nedostatků. (Tak jako se obyvatel rovníkové Afriky může pokusit radit Eskymákům se stavbou iglů, doporučil bych nicméně kandidátovi výrazně štedřejší ruku při používání určitých a neurčitých členů, které mohou být pro jednoznačnou interpretaci textu kritické).

Výše zmíněné připomínky v žádném případě nesnižují spíčkovou úroveň předkládané práce. Zde bych chtěl vyzvihnout velký objem a kvalitu práce odvedené na zajímavém a aktuálním tématu a schopnost kandidáta racionálně analyzovat a střízlivě hodnotit výsledky experimentů. Zároveň chci kolegovi Vaňkovi popřát hodně úspěchů v osobním životě i další vědecké kariéře, jestliže se tímto směrem bude ubírat.

Jako podklad pro diskuzi bych dizertantovi rád položil následující doplňující otázky:

1. Jaký je osud rukopisů uvedených v seznamu publikací jako „submitted“ a odeslaných do prestižních recenzovaných časopisů?
2. V publikaci submitované k recenznímu řízení, která popisuje krystalovou strukturu myšího NKR-P1A, je obšírně diskutována existence dvou typů dimerů v krystalové mřížce. Připojené biochemické a fyzikálně-chemické experimenty nicméně jednoznačně ukazují, že NKR-P1A je v roztoku přítomen ve formě monomeru. Jaká je podle autorů fyziologická relevance výše zmíněných dimerů, zvláště pak dimeru A? Jedná se pouze o krystalografický artefakt? Pokusil se

kandidát získat jinou krystalovou formu zmíněného receptoru, která by mohla nabídnout další úhel pohledu na potenciální dimerizační rozhraní?

3. V purifikačních krocích používá kandidát nosič Talon s navázaným kobaltem namísto běžnějšího zinečnatého kationtu. Mohl by kandidát popsat výhody a nevýhody jednotlivých nosičů, t.j. srovnání Talon-Co²⁺ a Ni-NTA z hlediska vazebné kapacity, afinity, výsledné čistoty proteinů či použití v přítomnosti redukčních činidel?
4. Receptor CD69 je připravován refoldingem z inkluzních tělísek, jelikož aktivní receptor se nepodařilo připravit jako rozpustný protein v *E.coli*. Pokusil se kandidát o přípravu rozpustného proteinu v buňkách Shuffle (New England Biolabs), které by, ve srovnání s Origami či Arctic Express, měly mít lepší charakteristiky a umožnit tvorbu disulfidických můstků i u obtížně exprimovatelných proteinů?
5. Jaká je zkušenost kandidáta se suspenzní kultivací HEK293 buněk? Je nutné tyto buňky pěstovat v atmosféře CO₂ nebo je dostačující používat média pufrovaná (hydrogen)uhličitany a buňky pěstovat pouze v temperovaných třepačkách, což by snížilo náklady na CO₂ inkubátory a umožnilo pěstovat buňky ve větších objemech?
6. K odštěpení C-koncových značek (tags) je používána „home-made“ proteáza HRV 3C. Tento přístup rozhodně šetří nemalé finanční prostředky, které by byly nutné k zakoupení komerčních preparátů. Mohl by kandidát stručně popsat postup purifikace HRV 3C a získané výtěžky? Jaké je srovnání HRV 3C s například TEV proteázou nebo trombinem s hlediska substrátové specificity, specifické aktivity, stability a dalších důležitých parametrů?

Závěrem s potěšením konstatuji, že předložená disertační práce je vynikající, naplňuje požadavky příslušných zákonných ustanovení a plně ji proto **doporučuji k obhajobě**.

Cyril Bařinka