

## **Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Ondřeje Vaňka.**

Mgr. Ondřej Vaněk vypracoval svoji doktorskou disertační práci pod vedením Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. na katedře biochemie, Přírodovědecké fakulty University Karlovy v Praze. Je psána v anglickém jazyce na 160 stranách textu, včetně příloh. Tématem práce je vývoj metody přípravy receptorů NK buněk (z anglického „natural killer cells“), jejich příprava a charakterizace, zejména z hlediska určení prostorové struktury pomocí rentgenové krystalografie. Autor pojal svoji disertační práci jako komentovaný soubor svých prací, které byly publikovány po dobu jeho doktorského studia.

Úvod je rozdělen do dvou tematických částí. V první z nich je podáno detailní vysvětlení problematiky NK buněk se zvláštním zřetelem na receptory na jejich povrchu. Tato část svědčí o autorově hluboké znalosti této problematiky. Druhá část je věnována přehledu metod, které byly využity pro vypracování této disertace. K této části bych si dovil malou poznámku. Vzhledem k tomu, že se v mnoha případech jedná o standardní metody, mohla by tato část být trochu stručnější, což by prospělo čtivosti práce. Výsledková část je zcela nahrazena kopiemi publikovaných prací, což je naprosto v pořádku. Zhodnocení dosažených výsledků je provedeno v závěrečné diskusi. Porovná-li vytyčené cíle a dosažené výsledky, nemohu než konstatovat, že je v této práci dosaženo nejen shody, ale autor mnohonásobně překročil to, co si na začátku práce předsevzal.

V práci jsem nenašel faktické chyby a typografických chyb je minimum. Velmi kladně hodnotím autorovu angličtinu, která je na vysoké úrovni. Moje úloha oponenta je v tomto případě jednodušší, protože všechny výsledky již prošly standardním recenzním řízením při jejich publikaci. K práci mám pouze následující poznámky a dotazy:

Poznámka 1. Na straně 25 píšete o jisté nevýhodnosti získávání bílkovin z inkluzních tělísek, konkrétně je zde poznámka, že pouze v některých případech je bílkovina z inkluzních tělísek úspěšně poskládána. Dovolil bych si poznamenat, že procento úspěšně poskládaných proteinů je poměrně vysoké, o čemž svědčí i to, že tato metoda byla v práci využita.

Dotaz 1. Na straně 38, uprostřed je věta, které ne zcela nerozumím: „The normal procedure is to fit protein backbone first then if the resolution permits , the sequence is inserted.“

Poznámka 2. Na straně 44, ve spodním odstavci je výraz „pretty resilient“, což je spíše hovorový obrat. Takovýchto slangových výrazů práce obsahuje minimum, zmiňuji to spíše jen jako důkaz své pečlivosti.

Dotaz 2. Pro strukturní studii receptoru CD69 se evidentně nejlépe hodil mutant CD69NG70. Platí takové nepsané pravidlo, že pokud použiju pro jakoukoliv studii mutant, měl bych mít jakousi představu o konkrétním vlivu provedené mutace. Máte nějakou informaci o možné strukturní změně mutantu oproti divokému typu?

Dotaz 3. Tento dotaz se týká rozlišení fyzické a biochemické stability proteinů. Na straně 56 píšete, že mutant CD69CQ65 má vynikající fyzickou stabilitu, ale mnohem menší dlouhodobou biochemickou stabilitu. Očekával bych, že oba typy stabilit budou mít stejný trend. Můžete tuto skutečnost, prosím, okomentovat?

Dotaz 4. Týká se vazby N-acetyl-D-hexosaminu na CD69 receptor. Na straně 77 zmiňujete, že eluční čas se během gelové filtrace změnil z 36,5 min na 31.7 min díky vazbě ligandu na CD69 protein, jinými slovy změnila se velikost molekuly. Molekula hexosaminu, resp. dvě molekuly, které se na receptor váží, by samy o sobě tento efekt asi těžko vyvolaly. Nemůže být vysvětlením posun rovnováhy ve prospěch dimeru? Jinými slovy, nedochází zde ke stabilizaci dimeru díky vazbě ligandu jako je tomu v případě trojnásobného mutantu C48A/Q93A/R134A?

Předkládaná disertační práce je, podle mého názoru, velmi zdařilým dílem. Jejím vypracováním prokázal Mgr. Ondřej Vaněk velké tvůrčí schopnosti a znalosti a rovněž tak schopnost samostatné vědecké práce, proto jsem velmi rád, že mohu doporučit komisi pro obhajoby disertačních prací, aby jeho disertační práci přijala jako podklad pro udělení hodnosti Ph.D.