



RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.
Oddělení Proteinových struktur
Fyziologický ústav AVČR, v.v.i.
detašované pracoviště BIOCEV
Průmyslová 595
25250 Vestec
Tel.: +420 325873513
Email: veronika.obsilova@fgu.cas.cz

Oponentský posudek na práci

Structure and dynamics of the mouse C-type lectin-like receptors

Autor práce: Mgr. Lucie Hernychová

Předkládaná disertační práce Mgr. Lucie Hernychové se zabývá řešením struktury inhibičního receptoru C-lektinového typu Nkrp1b. Disertační práce vznikla na detašovaném pracovišti Mikrobiologického ústavu, v.v.i. v BIOCEV pod vedením RNDr. Petra Nováka, Ph.D.

Práce je členěna do obvyklých částí (úvod-literární přehled-cíle práce-materiál-metody-výčet publikací s komentovaným souborem výsledků a příspěvku autorky-podrobná diskuze-závěr-reference). Kopie tří publikací, které tvoří základ disertační práce Mgr. Lucie Hernychové, jsou uvedené formou přílohy. Všechny tři práce byly publikovány v mezinárodních časopisech s IF. Zvláště bych vyzdvihla publikaci v časopise *Journal of Proteomics* s IF 3.722, kde je Mgr. Lucie Hernychová první autorkou. U další publikace ve *Physiological Research* je rovněž první autorkou. Na třetí publikaci v *Molecules*, kde se jedná o přehledový článek, je pak spoluautorkou. Uvedeny jsou i dvě další spoluautorské publikace na jiné téma, které nejsou součástí disertační práce.

Práce je psána anglicky, formální úroveň a grafické zpracování je na dobré úrovni, i když se zde vyskytují mírné překlepy a gramatické nepřesnosti. Autorka v literárním přehledu detailně popisuje inhibiční receptory C-lektinového typu. V úvodu nechybí velmi pěkné ilustrace a schémata, která usnadňují pochopit popisovanou problematiku. Všechny použité literární zdroje jsou řádně citovány. Předkládaná práce si klade čtyři cíle: 1) produkovat a refoldovat Nkrp1b ektodoménu; 2) návrh modelu struktury a dynamiky Nkrp1b v roztoku; 3) určit úlohu určitých strukturních znaků Nkrp1b na jeho biologickou aktivitu; 4) navrhnout reprezentativní strukturní model Nkrp1b. V rámci prvního cíle se podařilo optimalizovat protokol pro efektivní expresi a purifikaci Nkrp1b o dostatečné čistotě s výtěžkem přibližně 10 mg z 1 litru LB média, což bylo publikováno v časopise *Physiological Research*. V rámci ostatních cílů bylo mapováno vazebné rozhraní pomocí celé řady technik hmotnostní spektrometrie, kdy bylo zjištěno, že Nkrp1b tvoří jak kovalentní, tak i nekovalentní homodimery. Zajímavým zjištěním bylo, že pouze monomery mají biologickou aktivitu. Dále byl vytvořen strukturní model v monomerním i dimerním uspořádání a pomocí MD simulace určena jeho stabilita. Výsledky byly publikovány v *Journal of Proteomics*.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám několik dotazů:

- 1) Pro mapování vazebného rozhraní jsme použili metody hmotnostní spektroskopie, nebyla však použita vodíko-deuteriová výměna. Byl pro to nějaký důvod?
- 2) Proč jste pro charakterizaci oligomerního stavu Nkrp1 nepoužila metodu analytické ultracentrifugace, pomocí které byste určili přesnou rovnováhu mezi monomerem a dimerem a hodnotu disociační konstanty?
- 3) Můžete v krátkosti shrnout princip aktivní eseje pomocí fluorescenční mikroskopie?
- 4) V rámci nepublikovaných výsledků jste uvedla mimo jiné i pokusy o krystalizaci Nkrp1b ze dvou myších kmenů. V PDB databázi jsou tři struktury Nkrb1b samotného nebo v komplexu (PDB kódy: 5J2S, 5TZN, 6E7D). Nezkoušela jste tyto podmínky krystalizace? Jak velkou část proteinu jste se pokoušela krystalovat? Jak se liší Váš model od publikovaných struktur?
- 5) Jak tento výzkum přispěje k dalšímu výzkumu NK receptorů?

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Lucie Hernychové představuje cenný přínos pro lepší pochopení regulace a funkce Nkrp1b receptoru. Je zřejmé, že kandidátka si při řešení vytčených cílů osvojila řadu velmi sofistikovaných technik, především metody rekombinantní produkce a refoldování proteinu v *E. coli*, i v savčích buňkách, metody hmotnostní spektroskopie a homologního modelování, proteinové krystalografie a biochemické charakterizace zahrnující fluorescenční mikroskopii. Výsledky práce jsou dobře diskutovány a dávány do souvislostí. Autorka ve své disertační práci dokázala, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce. Předložená práce Mgr. Lucie Hernychové více než vyhovuje všem požadavkům kladeným na disertační práci, a proto ji plně doporučuji k přijetí.

V Praze dne 6. 5. 2019

RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.