

**UK v Praze Přírodovědecká fakulta
katedra buněčné biologie**

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno oponenta: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.
	Datum: 22.5.2014
Autor: Bc. Lucie Hernychová	
Název práce: Studium interakce lektinových receptorů přirozených zabíječů s jejich proteinovými ligandy Studies on interactions between natural killer cell lectin receptors and their protein ligands	



Oponentský posudek diplomové práce

Oponent:	RNDr. Karel Drbal, Ph.D.	Datum: 22. 5. 2014
Autor:	Bc. Lucie Hernychová	
Název práce:	Studium interakce lektinových receptorů přirozených zabíječů s jejich proteinovými ligandy Studies on interactions between natural killer cell lectin receptors and their protein ligands	
Instituce:	Univerzita Karlova v Praze	
Školitel:	RNDr. Petr Novák, Ph.D.	
Konzultant:	RNDr. Hynek Mrázek, Ph.D.	

Souhrn posudku:

Předložená diplomová práce má poměrně ambiciózní cíle, které souvisí s hlavním zaměřením laboratoře Školitele. Při jejím čtení jsem se dozvěděl mnoho důležitých souvislostí a mohu říci, že autorka splňuje moje požadavky na kritické myšlení a syntézu informací - na 100 stranách textu popisuje velice komplexně roli NK buněk v imunitním systému a spektrum jejich cílů, souvislosti s imunopatologickými ději, signalizací a uvádí čtenáře detailně do problematiky NK receptorů, jejich funkce a struktury. Experimentálně zdatnou část autorka dobře rozděluje podle cílů práce a dosažených výsledků. Na první pohled je patrné, že si autorka prošla velmi bohatou laboratorní zkušeností, kterou jistě dobře využije v její další kariéře.

Z formálního pohledu se jedná o velmi zdařilou práci s 33 obrázky a 19 tabulkami, kde některé jsou převzaté a jiné vlastní. Některé převzaté a upravené obrázky nejsou označené (např. obr. 1.4) nebo je možné, že jsou skutečně původní, a pak jsou ovšem velmi kvalitní. Tabulky neobsahují komplexní informace, většinou zde chybí výčet interagujících receptorů. Nicméně velice dobře korespondují s textem.

Z vědeckého hlediska je práce silně nadprůměrná. Dozvěděl jsem se mnoho nových a důležitých informací, některé z nich mě překvapily a proto se k nim vracím v poznámkách níže a otázkách na autorku. Citace jsou velmi dobře zvolené a jsou současného data.

Vysoce hodnotím multidisciplinární přístup a schopnost spolupráce s mnoha dalšími laboratořemi. To je prvek, o který je třeba v české vědě stále pečovat. K volbě tématu je třeba autorce a laboratoři poblahopřát. Tyto ambice nicméně vytváří závazek zvládnutí metodiky a problematiky z více oborů. To rozhodně není jednoduché a autorka zde stojí teprve na počátku.

Detailní posudek:

K vlastní práci mám několik důležitých výtek, a to hlavně z faktických důvodů.

V **úvodu** autorka dobře popisuje strukturní a funkční roli vybraných molekul NK buněk. Často se zde objevují nepřesnosti v použité terminologii. Některé problematické termíny pochází z přímého překladu z angličtiny a v češtině jsem se s nimi nesetkal, například „vrozené lymfocyty“. Termín „*innate*“ je lepší překládat jako „přirozený“, protože nemá nic společného s dědičností. Obdobně není vhodné používat „fétus“, ale lépe „plod“ (str. 14).

Autorka dělá časté chyby při uvedení termínů a zobecnění pravidel, o kterých dále hovoří. Mnoho obecných tvrzení vyžaduje další vysvětlení. Autorka často necituje zdroje nebo používá ne úplně pravdivá tvrzení, která nejsou daná do souvislosti s literaturou. Tak například na straně 12: „... nejbliže (NK buňkám) jsou γδ T lymfocyty a iNKT (invariant Natural Killer) buňky. Spojuje je exprese molekul jako je CD2, CD7, CD90 nebo IFN-γ.“

- Chybí zde jasné vymezení NK buněk k dalším typům podobně zaměřených buněk – NKT, CD8+ T lymfocytů, včetně exprese NK receptorů. Není zmíněná exprese NK receptorů na T lymfocytech a NKT lymfocytech.
- Integrin CD11b je sice myeloidním znakem, ale je rovněž exprimovaný na povrchu aktivovaných cytotoxických CD8+ T lymfocytů, společně s CD28, CD57 a také u jiných T lymfocytárních populací.

- Pro myší buňky není typická exprese molekuly CD27, ale znaku DX5, který je identický s CD49f.
- Začlenění NK buněk do ILC stále není široce akceptované. Není jasné, v jakém vztahu jsou LAK buňky k NK buňkám.
- Překonání aktivační prahu u NK buněk není balancí mezi aktivačními a inhibičními signály, ale synergistickým působením aktivačních signálů v přítomnosti/nepřítomnosti licencování - tedy inhibičního signálu, který zde má ovšem opačný význam. Při jeho absenci je buňka snáze aktivovaná a nepotřebuje tedy tak silný aktivační signál.

Úvod končí předčasně, není zde rozvedené téma souvisejících struktur C-lektinových molekul, jejich dimerizace, role krčku a chybí popis dalších detailů struktury, která je hlavní náplní diplomové práce. Chybí zde i popis přítomnosti zmiňovaných ITIM u inhibičních NKR-P1 receptorů.

Názvosloví genů je špatně použité. Jedná se o chronický problém. Myší gen *Nkr-p1b* má oficiální název *Klrb1b* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/80782>) a nikoli KLRB1B (str. 29). Preferoval bych tento oficiální název, i když chápu, že laboratorní konvence dává přednost *Nkr-p1b*. Autorka uvádí souvislost mezi oběma názvy a zmiňuje oficiální název v práci na jednom místě, bohužel ne při první zmínce o *Nkr-p1b*. Myší a krysí nomenklatura je popsána zde: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#genesym> a zakládá se na použití rozdílné konvence při psaní genů (*Klrb1b*) a proteinů (KLRB1B). Následně je proto přesně definované, že se jedná o gen, resp. protein. Konvence je třeba ctít a dodržovat při vědomí, že pro různé živočišné druhy je jiná (<http://www.genenames.org/about/faq#otherspecies>). U proteinových názvů se neliší konvence u proteinových názvů a je proto vždy nutné popsat, zda se jedná o myší nebo lidský homolog.

Metodická část je na 30 stranách důkladně provedená pro chemickou a biochemickou část experimentů. Její rozsah svědčí o širokém záběru autorky. Přesto zde více detailů chybí.

U molekulárně-biologické části jsem v kapitole 4.1 postrádal mapy vektorů a inzertů. Není proto na první pohled jasné, jak konstrukty vypadají. Absence genetických značek by byla evidentní.

Postrádal jsem zde také detaily, které se vztahují k SPR měřením (povrchová plazmonová rezonance), včetně typu přístroje, provedených kontrol (při negativním výsledku) a způsobu analýzy dat. Není popsáno, jakým způsobem byla provedena imobilizace molekul pro SPR experimenty (str. 60) při absenci genetických značek na rekombinantních proteinech. Nejsou následně zveřejněny negativní výsledky, což bych doporučil.

Pro biologickou část práce zde chybí více důležitých parametrů. Sekvence syntetizovaného genu *Nkr-p1b* byla zveřejněna až v kapitole Výsledky místo Metodika a chybí koordináty použitých biologických látek. Vůbec není zřejmé, jak byl získán CLR-B protein. Není jasně identifikovaný kmen myši s MHC-II/GFP (jejím číslem z MGI databáze), chybí zdroj i citace (str. 60). Je dobře, že autorka kredituje osoby, které se na experimentech podílely, ale již nesdílí, jak tyto byly provedeny, jaké konkrétní medium bylo použito atd. Následně není proto možné podle uvedené metodiky experimenty zopakovat. Metodika má detailně popsat JAK bylo postupováno. U biologických látek a experimentů je to mnohem důležitější, a to vzhledem k variabilitě biologického materiálu. Negativní kontrola pro imunohistochemii na permeabilizovaných buňkách bez značení je nedostatečná. Pro podobný typ experimentů je nutné použít více kontrol se začleněním rekombinantních proteinů obsahujících stejné genetické značky, případně nereagující protein podobné struktury, ale ne reaktivní část zkoumaného proteinu. Pouze předpokládám, že „Peanut lektin aglutinin“ je ekvivalentní PNA.

K **výsledkům** mám dotazy pro autorku níže. Některé výsledky byly zmíněny až v rámci **diskuze**. Autorka velice dobře diskutuje hlavní výsledky, včetně rozdílných přístupů k získání strukturních dat. Poukazuje na možný rozdíl ve struktuře inhibičního NKR-P1B vzhledem k volnější pozici flexibilní smyčky proti aktivačním NKR-P1 receptorům.

Závěr neobsahuje konkrétní dosažené výsledky, s konstatováním že byly nebo nebyly dosaženy. Autorka již nezmiňuje, jakých konkrétních pozitivních výsledků dosáhla, hlavně pro body č. 3 a 5.

Celkově lze předloženou diplomovou práci hodnotit vysoce pozitivně s velkým potenciálem do budoucna. Bude nutné, aby autorka pokračovala v navržených experimentech směrem k detekci vazby rekombinantních NKR-P1B proteinů na povrch buněk za různých podmínek a koexpresi s CLR-B. Přeji autorce, aby její snaha o nové pohledy a přístupy vyústila v zasloužený úspěch v podobě publikace, který přejí též celé laboratoři školitele.

Doporučení:

Jednoznačně doporučuji práci k obhajobě a autorce navrhuji udělení titulu Mgr.

Otázky:

1. Jakou část práce na diplomové práci strávila autorka na přípravě konstruktů a kolik tato příprava stála?
 - a. Srovnajte prosím, kolik úsilí jste skutečně věnovala jednotlivým cílům a kolik byste dnes chtěla ideálně věnovat jednotlivým etapám své diplomové práce.
2. Je skutečně známý alelický polymorfismus jednotlivých NKR-P1 genů u myších kmenů? Je rozsahem srovnatelný s jinými systémy NK receptorů? Viz NKR-P1B a NKR-P1D na str. 28: „Receptory jsou vzájemně výrazně homologní v aminokyselinové sekvenci (>80%), což souvisí s jejich alelickým polymorfismem (například receptor NKR-P1D u myšičího kmene B6 je alelickou formou receptoru NKR-P1B u myšičí BALB/c).“
3. Lze srovnat model dimerizace NKR-P1B a CLR-B ligandu se zmíněným modelem vazby monomerního NKp65 s dimerním KACL (Obr. 1.10).
 - a. Můžete komentovat predikci struktury vazby CLR na monomerní NKR-P1 vs. dimerní. Které části molekul se podílí na vazbě v modelu tetrameru (dimeru dimerů)?
 - b. Lze tuto informaci využít k interpretaci vazebných výsledků monomerů/dimerů NKR-P1B na živých buňkách.
4. C-lectiny potřebují pro svoji vazebnou funkci přítomnost Ca^{2+} iontů.
 - a. Jak vysvětlíte dostatečnou koncentraci Ca^{2+} iontů v použitém fosfátovém pufru při vědomí vzniku precipitátu?
 - b. Jak jste kontrolovali efektivní koncentraci vápníku ve fosfátovém pufru v SPR experimentech (viz str. 88)?
 - c. Jaký jiný pufr byste použila pro zajištění reprodukovatelné koncentrace Ca^{2+} iontů?
5. Skutečně jste izolovala rekombinantní proteiny NKR-P1B a CLR-B bez genetických značek a afinitního systému?
 - a. Jaká byla jejich skutečná čistota?
 - b. Jak lze chápat pojem „dostatečná čistota“ na str. 72-73?
 - c. Je nějaký důvod k vyloučení běžného způsobu izolace pomocí genetických značek?

RNDr. Karel Drbal, Ph.D

Praha, 22.5.2014

Katedra buněčné biologie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze
Viničná 7, 128 43 Praha 2
Česká republika

email: karel.drbal@natur.cuni.cz

web: www.natur.cuni.cz/biologie/bunecna-biologie/pracovni-skupiny/Molekularni_dynamika_imunitni_odpovedi