



Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky : *Bc. Kristián Skála*

Název práce: **Studium extracelulární části myšního receptoru Nkr-p1b přirozených zabíječských buněk pomocí NMR**

Diplomová práce Kristiána Skály se zabývá přípravou a strukturním studiem myšního receptoru Nkr-p1b přirozených zabíječských buněk. Práce cílí na zajímavá a aktuální téma mající potenciál přispět k pochopení komplexního mechanismu inhibice NK buněčné cytotoxické aktivity, a tak nepřímo pomoci k pochopení a nádorové rezistence a potenciálně i terapie virových onemocnění.

Autor v úvodu práce velmi přehledným způsobem uvede čtenáře do problematiky studia struktury proteinů a nastíní i možnosti aktuálně dostupné metodiky. Dále se věnuje popisu funkce a struktury zájmového proteinu i jemu příbuzných receptorů C-lektinového typu. Experimentální část dokladuje, že autor získal řadu originálních poznatků a velmi dobře zvládl metody heterologní exprese a purifikace rekombinantních proteinů *E. coli* včetně refoldingu proteinu z inkluzních tělísek. Připravil kromě neznačené ligand vázající domény myšního Nkr-p1b receptoru také její jednoizotopově a dvojjizotopově značenou ($^{15}\text{N}+^{13}\text{C}$) formu. Získané preparáty samostatně či ve spolupráci s dalšími spolupracovníky charakterizoval pomocí zavedených i moderních metod, zahrnujících např. cirkulární dichroismus, hmotnostní spektrometrii či dynamický rozptyl světla. Také se zabýval zájmovým proteinem z hlediska jeho dlouhodobější stability, což bylo důležité pro hlavní experimenty prezentované v práci, tedy určení 3D struktury LBD domény myšního Nkr-p1b receptoru pomocí NMR experimentů. Autorovi se tak podařilo přiřadit drtivou většinu signálů atomům proteinové páteře a vytvořit tak v kombinaci s homologním modelováním přibližný model struktury studovaného proteinu. Jak naznačuje v diskusi v plánu jsou i další NMR experimenty s připravenými vzorky, které by měli v budoucnu poskytnout přesnější strukturní informace včetně možnosti studia dopadů interakce s ligandy.

Práce je podle mého názoru po formální, odborné i jazykové stránce velmi dobře zpracovaná, obsahuje jen malé množství drobných chyb spíše charakteru překlepu. Používá standardní členění, rozsah práce i použité citace jsou adekvátní danému typu práce.

K práci bych měl několik připomínek a také dotazů k diskusi:

1. Na str. 16 v kapitole Přírozeně nestrukturované proteiny uvádíte, že “Přibližně 30% proteinů je takzvaně nestrukturovaných nebo strukturovaných jen částečně“ (podpořeno jednou citací). A kousek dále pak větu: „Nestrukturované proteiny mohou přecházet mezi různými strukturními uspořádáními, ...“. Zde bych si dovilil poukázat, na ne příliš šťastný překlad použitého termínu do češtiny, ale i faktický obsah tvrzení, se kterým mám trochu problém se ztotožnit. Můžete nějak přiblížit Vaše chápání termínu „nestrukturovaný protein“? Ne úplně správnou představu také vyvolává v práci místy hojně pro proteiny používaný termín „náhodné klubko“.
2. V práci bylo věnováno dosti úsilí odhadu stability proteinu za podmínek, které by měli panovat při dlouhém NMR měření. Bylo by jistě zajímavé vědět, zdali se oligomerní formy proteinu v průběhu či na konci NMR měření skutečně neobjevili. V textu jsem nenalezl přesné podmínky, za kterých probíhaly NMR, DLS, a CD měření především pH, koncentrace pufru, přítomnost Ca^{2+} iontů.
3. V práci provedené měření DLS udává hodnotu jednoznačně odpovídající dimeru a gelová chromatografie bez provedení kalibrace kolony není dostatečně přesný ukazatel velikosti proteinu. Také SDS elfo, byť bez redukčního činidla, nemůže zachytit potenciálně přítomný nekovalentní dimer. Krom toho známá struktura prakticky zcela homologního proteinu Nkr-p1a je homodimer. Jaké experimenty je možné provést, aby bylo možné rozhodnout, zda je zkoumaný protein nativně monomerní?
4. Jaká je strukturní podobnost (např. RMSD) mezi, v práci navrženou strukturou Nkr-p1b (Obr. 41 na str. 72) a nejbližším homologem tedy strukturou Nkr-p1a určenou pomocí X-ray?
5. V závěru na str. 76 je možná chyba ve větě: „Přibližně polovina struktury studovaného proteinu je ve formě β -skládaného listu, čtvrtinu tvoří α -helix a čtvrtinu náhodné klubko“?

Závěrem konstatuji, že si nemyslím, že výše uvedené diskusní podněty, jakkoliv snižují kvality předložené práce Bc. Kristiána Skály, ta dle mého názoru zcela splňuje požadavky kladené na práce tohoto typu a plně ji doporučuji k obhajobě.

Navrhovaná klasifikace:

Datum vypracování posudku: 19. 5. 2017

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS):

Doc. RNDr. Václav Martínek, PhD.