

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci RNDr. Kataríny Pšenákové.

RNDr. Katarína Pšenáková předložila k obhajobě svoji dizertační práci s názvem „Structural Studies of Selected Signaling Protein Complexes“ ve formě komentovaného souboru výsledků, které byly již publikovány v recenzovaných mezinárodních periodikách. Autorka vypracovala svojí práci pod vedením prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecké fakulty University Karlovy. Konzultanty práce byli RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D. a Ing. Václav Veverka, Ph.D.

Práce je napsána v anglickém jazyce a obsahuje 85 stran textu a přílohu, která je tvořena kopiemi pěti autorčiných článků, ve kterých byly, případně budou publikovány výsledky, jež jsou předmětem této dizertace. Tématem práce jsou strukturní studie čtyř signálních proteinů, případně jejich komplexů pomocí různých instrumentálních metod.

Jak jsem již zmínil v úvodu, dizertační práce je napsána anglicky, což je v dnešní době dobrým standardem. Co však rozhodně standardem není, je nejen vynikající zvládnutí jazyka, ale též stylu psaní vědeckých textů, který je též na velmi vysoké úrovni. Práce je bez gramatických chyb a překlepů. Všechny výše zmíněné atributy přispívají k velmi dobrému pocitu čtenáře při čtení této práce. Do úvodní kapitoly zařadila autorka stručné seznámení se všemi studovanými systémy a vysvětlila jejich funkce. Následuje podrobnější popis základů dvou nejpoužívanějších metod a to NMR a SAXS. Kapitola o výsledcích je členěna podle již zmíněných čtyř systémů, jejichž studiu se autorka věnovala. Každá část je uvedena kapitolou, kde je popsána motivace studie příslušného systému, což velmi usnadňuje orientaci v textu. Samotné výsledky jsou popsány stručně a výstižně, a pokud se čtenář zajímá o detaily, je odkázán na originální články, které jsou součástí dodatku. Vzhledem k tomu, že ve všech projektech bylo využito vícero instrumentálních technik, považuji za velmi vhodné, když dizertant/ka zdůrazní svůj příspěvek, což Dr. Pšenáková činila velmi důsledně. Co se týče množství odvedené práce a kvality dosažených výsledků, domnívám se, že by vystačily minimálně na dvě dizertační práce. K práci mám následující dotazy a připomínky:

Str. 20, předposlední řádek: „... methyl groups from phenylalanines...“

Toto je zřejmě překlep a uvádím jej jako důkaz, že jsem práci četl opravdu důkladně.

Str. 49, obr. 4.6: Zde mi není úplně jasné, co vyjadřuje tam uvedená škála, např. „protection >15%, deprotection 9-14.9 %...“. Bylo by přehlednější toto vysvětlit v textu k obrázku .

Kapitola 4.3.3.: Tato kapitola se mi jeví jako poněkud neuzavřená. Chybějí mi tam údaje o způsobu, jakým byla vytvořena struktura komplexu 14-3-3 proteinu a procaspase-2. Víím, že toto vše lze dohledat v originálním článku, nicméně by se to hodilo zmínit i několika větami zde.

Str. 60, obr. 4.13.: Na tomto obrázku je poněkud podivné číslování atomů vodíku. Není bezpodmínečně nutné v tomto případě dodržovat pravidla IUPAC, ale číslování by mělo mít nějaký systém a ne takto na přeskáčku.

Dále v popisu k tomuto obrázku jsou zmíněny chemicky ekvivalentní vodíky 1-7, což mi přijde podivné. Tyto vodíky nejsou chemicky ekvivalentní, to by musely mít v NMR spektru jeden signál.

Dotaz 1:

V kapitole 4.2. je zmíněn výpočet struktury komplexu CaMKK2 kinase a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ pomocí programu HADDOCK. Předpokládám, že pro výpočet byly použity experimentální data získaná všemi zde popsanými metodami. Chci se zeptat, zda-li byly do výpočtu zahrnuty i údaje o omezení vzdáleností získané z „cross-link“ experimentů, když byla použita činidla s jasně definovanými vzdálenostmi mezi reaktivními skupinami (DSG a DSS).

Dotaz 2:

Otázka se týká uspořádání experimentu, resp. experimentálních podmínek pro sledování vazby molekuly S9 na protein FOXO3-DBD. Snaha vyhnout se použití DMSO pro vazebnou studii je jistě chvályhodná, neboť DMSO je prostředí velmi rozdílné od vody a při jeho použití je třeba nejprve zjistit jeho vliv na strukturu a chování zkoumaného proteinu. Nicméně náhrada původní molekuly jejím iontem velmi změní elektronické poměry celého ligandu, který potom může vykazovat odlišný vazebný mód. Prosím o komentář.

Dotaz 3:

V závěru ke kapitole 4.4.3. je řečeno, že molekula S9 by mohla inhibovat vazbu DNA na FOXO3. Avšak disociační konstanta vazby S9 na tento protein je pouze 0,5 mM. Předpokládám, že afinita samotné DNA je mnohem vyšší, proto bych chtěl vysvětlit, jak by tato inhibice mohla probíhat. Byla již provedena nějaká esej?

Dotaz 4:

V kapitole 4.5.2. je zmínka, že pro vazbu thioredoxinu na ASK1 je podstatný Cys250. V téže kapitole je však také napsáno, že z „cross-link“ experimentu je zřejmé, že interakční místo tvoří Cys200. Nevím, jestli mi zde něco neuniklo nebo je to překlep.

Dotaz 5:

Můj poslední dotaz se týká strukturní studie ASK1-TBD. Je zřejmé, že chybějící signály v NMR spektru ASK1-TBD způsobuje nevýhodná chemická výměna. Nepokusili jste se nasnímat nějaká NMR data přímo na komplexu ASK1-TRX? Je mi jasné, že ta molekula by byla již dost veliká (180+105 AA) na přímou strukturní studii, ale vazba TRX by mohla tuto chemickou výměnu modulovat.

Zmíněné poznámky a výtky naprosto nesnižují kvalitu této disertační práce, která je velmi zdařilým dílem. Jejím vypracováním prokázala RNDr. Katarína Pšenáková značné tvůrčí schopnosti a znalosti a nelze než doporučit komisi pro obhajoby disertačních prací, aby její disertační práci přijala jako podklad pro udělení hodnosti Ph.D.

V Praze, dne 7.2.2019

prof. Ing. Richard Hrabal, CSc.