

Posudek oponenta
na disertační práci s názvem
Studium struktury a funkce modelových hemových proteinů
jejíž autorkou je
RNDr. Alžběta Lengálová

Práce je zaměřena na studium hemových sensorových proteinů. Sensorová funkce hemoproteinů byla objevena poměrně nedávno, a proto jsou proteiny této skupiny v současnosti stále velmi intenzivně studovány. Rozhodně je možno konstatovat, že téma práce je aktuální a originální.

Konkrétně byla v práci studována struktura a mechanismus přenosu signálu u dvou sensorových proteinů citlivých na plyny, proteinu AfGcHK (detektor dikyslíku - kinasa v půdních bakteriích rodu *Anaeromyxobacter*) a YddV (senzor dikyslíku - diguanylátcyklasa z *E. coli*). Práce se dále věnuje popisu vlastností dvou eukaryotických sensorových proteinů pro hem (HRI a Bach1). Je možno shrnout, že byly získány cenné originální výsledky, charakterizující celkovou strukturu studovaných proteinů (pomocí rentgenové krystalografie, H-D výměny a spektrální charakterizace sensorů) a umožňující diskusi a úvahy o mechanismu přenosu signálu mezi jejich doménami.

O kvalitě práce svědčí fakt, že je formálně sepsána jako komentář k souboru čtyř publikovaných prací, na nichž se disertantka autorsky podílela (ve třech případech jde o originální publikace, v jednom o přehledný článek). Přitom všechny čtyři práce byly publikovány v prestižních časopisech s vysokým impaktním faktorem. Tento fakt je třeba vyzdvihnout zejména také proto, že od zadání práce k jejímu odevzdání uplynulo méně než čtyři roky. To, podle mého soudu, přesvědčivě dokazuje odborné kvality a péli autorky disertace, a jasně dokumentuje její schopnost samostatné vědecké práce. Uvádím zde toto hodnocení (které je jinak spíše zvykem psát až na konec posudku) proto, abych jeho vytknutím jakoby „před závorku“ jasně řekl, že následující poznámky a dotazy, ať již věcné nebo formální, nemají nijak snižovat kvalitu práce, kterou hodnotím jako výjimečně vysokou.

Práce je sepsána v českém jazyce, čtivým (místy na staršího, konzervativního oponenta, možná až příliš „beletristickým“) slohem formou komentáře k publikacím, obsahuje celkem 52 stran a 10 obrázků (vlastní text, po odečtení formálních a „technických“ částí, zaujímá 36 stran). Práce je členěna na „Teoretický úvod“ (správnější by asi byl název „současný stav problematiky“ nebo prostě „přehled literatury“) v rozsahu 9 stran, cíle práce (1 str.) a komentář a diskuse k souboru publikací (22 stran), závěr. Doporučuji také vyhnout se téměř doslovnému opakování formulací (např. závěrečný odstavec na str. 17 vs. v mírně rozšířené verzi závěrečný odstavec na str. 40).

Součástí řízení k obhajobě je také autoreferát, který je předložen v jazyce českém a anglickém (zřejmě proto má dvě titulní strany a ještě třetí uprostřed?) v rozsahu 15 stran textu - kromě stručné verze komentáře obsahuje oproti vlastní disertaci navíc údaje o publikační činnosti autorky, která vedle již zmíněných 4 publikací, shrnutých v předložené disertaci, a biografických dat zahrnuje ještě další originální práci v impaktovaném časopise s příbuznou tematikou a 8 plakátových sdělení na konferencích. (Zmiňuji jej mj. proto, že se na něj ještě v dalším budu odkazovat.)

Formu komentáře k publikacím považuji za vhodnou, jen mi z praktického hlediska trochu

vadilo, že diskutované publikace nejsou součástí práce (tedy její elektronické verze, kterou jsem dostal ze studijního oddělení a která je v SIS; podle všeho jsou v „master“ tištěné verzi, protože jsou podle nich číslovány strany). Jsou dostupné elektronicky, snadno jsem si je tedy opatřil a nenastal větší problém, jen nevím, čím je tento postup motivován (obavy z porušení „autorských práv“?, přísná aplikace čl. 12, odst. 1 Studijního a zkušebního řádu UK ?).

Jistý „filozofický problém“ mám s otázkou, lze-li formu komentáře prezentovat přehledný článek (který je vlastně sám „komentářem k souboru publikací“), ale pečlivým studiem Studijního a zkušebního řádu UK a souvisejících fakultních předpisů jsme dospěl k názoru, že to možné je.

Vážnější problém pro mne představuje to, že k části diskutovaných údajů (kapitola 1.2) jsem nebyl schopen dohledat příslušné experimentální práce/data - jedná se o práce disertantky? Podle autoreferátu se zdá, že by (aspoň zčásti) mohlo jít o plakátová sdělení uvedená po číslem 8, 10, 11, 12 (a možná i některá další); ta ovšem elektronicky dostupná nejsou. Domnívám se proto, že pokud disertantka tyto výsledky chtěla diskutovat, měla je uvést vč. experimentálních a metodických údajů. (Práce by tím získala zčásti „hybridní“ charakter, ale to podle mého soudu ničemu nevadí.)

Moc nerozumím (s výše zmíněným problémem související) formulaci „ V rámci zpracovávání disertační práce jsme se věnovali zejména dvěma zástupcům eukaryotických senzorů detekujících hem, a to transkripčnímu faktoru Bach1 a kinase HRI“ (str. 12 autoreferátu, následuje pasáž velmi stručně popisující provedené experimenty s temito senzory). Obdobná pasáž je i v disertaci (str. 34) Domníval jsme se, že se práce věnovala zejména senzorům detekujícím dikyslík (všechny tři originální publikace, celkově ze čtyř). Pokud se nemýlím a je to tak, asi byla přesnější např. formulace „v návaznosti na tuto práci jsme se věnovali také dvěma zástupcům“. V práci jsou tato data uvedena poměrně obsáhle (str. 32-40) ve „výsledkové části 3“ s odkazem na přehledný článek („kapitola 4.4“), v tom se mi ale žádný odkaz na práce disertantky najít nepodařilo. Bylo by dobře, aby v rámci obhajoby disertantka tuto otázku plně vyjasnila.

Pokud jde o věcnou stránku práce, mám několik dotazů:

1. Není mi úplně jasné, jak lze pomocí rtg. krystalografie zjistit, že „senzorová doména proteinu **za normálních podmínek** tvoří dimery“ (zdůraznění je mé). Podle mého soudu je vznik dimerů (resp často i oligomerů) běžným jevem při krystalizaci proteinů nebo jejich částí - může a nemusí přitom odpovídat jejich chování za reálných fyziologických podmínek. Prosím o vysvětlení v rámci obhajoby/diskuse.
2. V obhajobě nebo následné diskusi by také bylo vhodné ukázat, jak směsný oxidační stav krystalovaného a rtg. difrakcí analyzovaného *A/GcHK* umožňuje „snadno sledovat pohyb, který molekula proteinu koná při aktivaci a deaktivaci“ (str. 20 práce).
3. Mohla by disertantka dokumentovat, jak bylo pomocí UV/Vis spekter prokázáno, že v experimentu popsáném na Obr. 6 (provedeném v práci 4. 3., tam Obr. 1) je v průběhu měření enzymové kinetiky YddV zachován redoxní stav II pro adukt s dikyslíkem?

Závěrem ještě jednou konstatuji, že předložená disertační práce plně dokumentuje způsobilost RNDr. A. Lengálové k samostatné vědecké práci a plně ji **doporučuji k obhajobě a dalšímu řízení**.

V Praze, 9. 9 . 2020

prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.