



RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.
Fyziologický ústav AVČR, v.v.i.
Oddělení Strukturní biologie signálních proteinů
Detašované pracoviště BIOCEV
Průmyslová 595
252 50 Vestec
Tel.: +420 325873513
Email: veronika.obsilova@fgu.cas.cz

Oponentský posudek na práci

Úloha $F_{420}H_2$ -závislých reduktas v biosyntéze bioaktivních mikrobiálních metabolitů inkorporujících 4-alkyl-L-prolinový derivát

Autor práce: Mgr. Lucie Steiningerová

Předkládaná disertační práce Mgr. Lucie Steiningerové se zaměřuje na objasnění funkce Apd6 proteinů, které katalyzují poslední krok specializované APD dráhy pomocí $F_{420}H_2$ -závislé redukce. Disertační práce vznikla na Mikrobiologickém ústavu, v.v.i. pod vedením Ing. Jiřího Janaty, CSc.

Práce je členěna do obvyklých částí (úvod-přehled literatury-cíle práce-materiál a metody-výsledky-diskuze-souhrn-seznam literatury-přílohy). Kopie tří publikací, které tvoří základ disertační práce Mgr. Lucie Steiningerové, jsou uvedené formou přílohy. Všechny tři práce byly publikovány ve špičkových mezinárodních časopisech s vysokým impakt faktorem. Zvláště bych vyzdvihla publikace v časopise *Journal of the American Chemical Society* s IF 14.612, kde je Mgr. Lucie Steiningerová první autorkou a v *Nature Communications* s IF 12.121, kde je spoluautorkou. Oba dva časopisy se nacházejí mezi prvními deseti nejlepšími časopisy v daném oboru. Třetí spoluautorská publikace byla otištěna v časopise *Frontiers in Microbiology* s IF 4.235.

Práce je psána česky, velmi podrobně, celá práce bez příloh má 176 stran a obsahuje 317 citací. Formální úroveň a grafické zpracování je na výborné úrovni bez jakýchkoliv překlepů či gramatických nepřesností. Autorka v podrobném přehledu literatury (cca 40 stran) detailně popisuje 5-deazaflavinové kofaktory, dále pak aktinobakteriální komplexní metabolity s alkylprolynovým derivátem (APD) a s 4-methyl-L-prolinem (MPL) vyskytující se mimo Actinobacteria, genový základ pro biosyntézu aktinobakteriálních APD látek, dále pak popisuje dvě cesty vedoucí k aktinobakteriálním APD prekurzorům a MPL dráhu u sinic a hub. V přehledu nechybí velmi pěkné ilustrace a schémata (2 tabulky a 25 obrázků), která usnadňují pochopit popisovanou problematiku. Veškerý použitý materiál a metody jsou podrobně rozepsány na 35 stranách. Výsledky jsou podrobně popsány na 48 stranách textu s použitím 50ti obrázků a rovněž jejich diskuze zahrnuje 22 stran a 11 obrázků. Nechybí ani závěrečný souhrn. Všechny použité literární zdroje jsou řádně citovány.

Předkládaná práce si klade čtyři cíle: 1) připravit rekombinantní protein Apd6; 2) stanovit enzymovou aktivitu Apd6 proteinů; 3) objasnit redukční mechanismus LmbY; 4) objasnit podstatu rozdílné reakční specifity Apd6 homologů.

Mgr. Steiningerové se podařilo optimalizovat produkci šesti Apd6 homologních proteinů a určit jejich vazebné schopnosti ke kofaktoru, dále pak navrhla rozdílný mechanismus hydridového transferu v redukcích katalyzovaných Apd6 proteiny. Dále byla vytvořena schémata prediktivních aktivních míst Apd6 homologů a bylo připraveno 20 mutantních variant k otestování katalytické aktivity a objasnění molekulární podstaty odlišné reakční specifity. Takto charakterizované Apd6 představují vůbec první popsané

F₄₂₀H₂-závislé proteiny rodu *Streptomyces* z rodiny hydridových transferas odvozených od Luciferas (LLHT).

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám několik dotazů:

- 1) Pro přípravu rekombinantních proteinů Apd6 a FGD byla použita pouze jednostupňová purifikace – niklová afinitní chromatografie. Byla čistota proteinů dostatečná pro následující experimenty enzymové aktivity? Jak jste řešili případné agregáty? Jak jste řešili neoddělené chaperoniny u proteinů HrmD a GriH?
- 2) Pro purifikaci proteinů určeného pro krystalizaci jste používala iontově výměnnou chromatografii. Jaké bylo pI proteinů LmbY a Por15? Používala jste tedy kationtovou či aniontovou chromatografii?
- 3) Jaký pufr byl ve výsledku použit jako finální pro krystalizaci proteinů LmbY a Por15? Jaká proteinová koncentrace byla optimální pro růst krystalů (tab. 5.1 str. 130 a tab. 56.2 str. 132)? Jakým způsobem jste provedla kryoprotekci krystalů před mražením, aby nedocházelo k radiačnímu poškození (PEGem nebo glycerolem)?
- 4) Testovala jste stabilitu krystalovaných proteinů v jiných pufrch, např. metodou DSF?
- 5) Všechny Vámi připravených 20 mutantních variant Apd6 proteinů mělo nezměněnou katalytickou aktivitu a bylo stále schopno katalyzovat redukci dvojných vazeb. Jakým způsobem budou vytipovány další mutantní varianty k ověření substrátové a reakční specifity vzhledem k neznámé struktuře a nízké sekvenční podobnosti se známou strukturou archeálního Adf z LLHT rodiny?
- 6) Jakým směrem se bude ubírat Váš další výzkum v této oblasti?

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Lucie Steiningerové představuje cenný přínos pro lepší pochopení funkce Apd6 proteinů v Actinobacteria. Je zřejmé, že kandidátka si při řešení vytčených cílů osvojila řadu velmi sofistikovaných technik, především metody práce s DNA, rekombinantní produkce a purifikace proteinů, následná charakterizace purifikovaných proteinů, měření enzymové aktivity, kofaktor-vazebné studie, studie reakčního mechanismu, příprava proteinů pro krystalografii, bioinformatické analýzy.

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 Steiningerové více než vyhovuje všem požadavkům kladeným na disertační práci, a proto ji plně doporučuji k přijetí.

RNDr. Veronika Obšilová, PhD.
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., BIOCEV
22. září 2020