

Oponentský posudek na diplomovou práci

Petry Liškové
s názvem

„Vazebná místa pro ionty vápníku vně RTX domény u FrpC proteinu
Neisseria meningitidis“

Motivací k vypracování diplomové práce Petry Liškové je zejména skutečnost, že úloha FrpC proteinu v patogenezi nebezpečného původce neisseriové meningitidy je neznámá; přesto, že se jedná o protein vysoce imunogenní, jehož syntéza je indukovaná nedostatkem železa. Světlo by na tuto otázku mohlo vrhnout právě objasnění účinku Ca^{2+} na konformaci FrpC proteinu, který obsahuje několik vazebných oblastí pro Ca^{2+} . Těžiště diplomové práce leží v experimentech zaměřených na tento problém a ve vyhodnocování získaných dat. Navíc práce zkoumala i způsob interakce proteinu FrpC s makrofágy myšního původu a tedy možný způsob vstupu do hostitelské buňky. K pokusům byly použity kromě rekombinantního proteinu FrpC i jeho zkrácená varianta postrádající oblast RTX a dále její mutovaná forma s lyzinem místo asparaginu v pozici 521, ve které se právě předpokládá stabilizace Ca^{2+} .

K obhajobě je předkládána diplomová práce, vycházející z úspěšné a dlouholeté spolupráce dvou laboratoří, na PřF UK a v MBÚ AVČR, postavená na širokém metodickém záběru, který se soustředil na zkoumání úzce vymezené a jasně definované otázky – na strukturně-funkční analýzu proteinu, patrně s virulencím potenciálem. Experimentální úsilí přineslo své plody v řadě kvalitních výsledků a cíle práce tak byly naplněny.

Diplomová práce má rozsah 105 stran a klasické členění. Výstižný Úvod na 1 straně předchází Literárnímu přehledu; ten je relativně stručný, 13ti stránkový, zaměřený na proteiny RTX, protein FrpC a na jejího nositele *N. meningitidis*. Je škoda, že Přehled postrádá práce z posledních let – pouze 2 publikace z r. 2008 a že nebyl pojat do větší šíře, např. o popis dobře prozkoumaného ACT toxinu *B. pertussis*, který lze považovat za strukturní a metodický prototyp RTX proteinů a obě laboratoře se jeho studiem proslavily.

Čeho se snad nedostává Literárnímu přehledu, bohatě vyvažuje následující kapitola Materiál a metodika. Na 32 stranách je popsáno 33 metod a pracovních postupů, které kolegyně Lišková obdivuhodně zvládla. Od technik kultivačních, přes produkci rekombinantních proteinů, jejich purifikaci, až po stanovení enzymové aktivity. V práci dominují metody ustálené fluorescenční spektroskopie, jimiž bylo provedeno zevrubné šetření interakce fragmentů FrpC proteinu s vápenatými ionty. Zařazeno je i využití programu Rosetta 2.3.0 k předpovědi 3D struktury proteinů v oblasti vazby Ca^{2+} iontů a mikroskopické techniky pro sledování buněk a FrpC proteinu fluorescenčním a konfokálním mikroskopem. Metody jsou v diplomové práci zpracovány pečlivě, přesně a přehledně.

Kapitola Výsledky na 33 stranách dokumentuje kromě vlastních dat, zejména pracnost pokusů a mimořádné pracovní nasazení P. Liškové, se kterým překonávala potíže zaváděných metod, jak naznačuje např. strohé konstatování na str. 74: “ Při precipitaci proteinů $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dala asi jen polovina provedení správný výsledek a proteiny nebyly naštěpeny či destruovány“.

Diskuse výsledků je vedena na 7 stranách textu. O jejím pojetí vypovídá počet citovaných prací, kterých je osm. Dominuje tedy v diskusi interpretace, případně zamyšlení nad metodickými úskalími, které se většinou podařilo zdárně překonat, nad polemikou s publikacemi podobného zaměření.

Souhrn na 1 straně je střízlivý a možná příliš skromný v poměru k množství odvedené práce.

V seznamu literatury je uvedeno 70 literárních pramenů, z toho nejnovější 3 z r. 2008. + *Práce obsahuje*

Abstrakt a AD i seznamu k obrádkům!

Formální úprava práce je kvalitní, obsahuje 21 barevných obrázků a grafů, které dobře ilustrují textovou část výsledků. Na čtení je příjemný i typ a velikost písma – ARIAL 12. Pravopis cizích slov je důsledně konzervativní, až na drobné výjimky typu „kolokalizace“/internalisace v odstavci 4.8.2., v textu se občas objevuje iont vápníku místo ion; absolutní teplota se vyjadřuje v Kelvínch, nikoliv ve °K (Obr. 16). Překlepy a občas neobratné vyjadřování svědčí spíše než o nedostatku pečlivosti o nedostatku času na jazykovou korekturu.

Při pročítání diplomové práce vyvstaly následující otázky, o jejichž zodpovězení prosím autorku, P.Liškovou:

1. Jaké byly výtěžky rekombinantních proteinů FrpC z 500 ml kultury E.coli?
2. Byla fluorescenčně spektroskopická měření prováděna i při jiné koncentraci proteinů než 2 – 3 ug/ml nebo byla tato koncentrace převzata z literatury?
3. Str. 68, Obr. 13: Křivka vypočtená z Hillovy funkce pro protein FrpCΔRTXD521K neprochází experimentálními body. Proč?
4. Str. 71, Obr. 14 A: Nemohlo v pokusech vytěšňování Te³⁺ ionty vápníku z proteinu FrpCARTX pro modifikované Stern-Volmerovo vynesení, případně při stanovení r (Obr. 15) docházet současně ke štěpení proteinu? Použité koncentrace Te³⁺ i Ca²⁺ by to dovoľovaly (Obr.10, str. 62).
5. Sekvence EF-hand motivu z FrpC proteinu odpovídá konsenzu kanonického EF-hand motivu, přesto se nepodařilo předpovědět jeho 3D strukturu pomocí software Rosetta ++2.3.0.
Byla publikována 3D struktura některého z eukaryotních EF-hand proteinového motivu, která by byla inspirací pro hledání 3D struktury FrpC? V Literárním přehledu není zmíněna.
6. Str. 85 – 92 Interakce proteinu FrpC s myším makrofágem:
Do jaké míry se podle Vás blíží tyto pokusy in vivo situaci? (extracelulární koncentrace Ca²⁺ je cca 2 mM; x ABC transportér).
Pokusy probíhaly bez přítomnosti Ca²⁺. Domníváte se, že jejich přidání by mohlo interakce pozorované mezi makrofágem a purifikovaným proteinem ovlivnit? Případně jak?

Závěrem lze konstatovat, že diplomová práce přesahuje svou metodickou a experimentální částí standardní diplomovou práci a bude dobrou výchozí pozicí pro následné doktorské studium. Myslím, že přes výše uvedené drobné formální nedostatky by práce P.Liškové měla být přijata jako práce diplomová a klasifikována jako výborná.

Doc/RNDr. Jaroslava Scvobodová, CSc.,

V Praze, 18.9.2009