

Structural study of the ASK1:thioredoxin complex

Ve své diplomové práci se Bc. Katarína Pšenáková věnuje experimentálnímu studiu komplexu ASK1: thioredoxin, které zahrnuje jak expresi a purifikaci příslušných proteinů, tak jejich charakterizaci pomocí celé řady instrumentálních metod včetně dynamického rozptylu světla, malúhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS) a CD spektroskopie.

Délka 98 stran je na diplomovou práci, která je navíc psána velmi dobrou angličtinou, úctyhodná. Umožňuje autorce jednak opatřit práci rozsáhlým a pečlivě zpracovaným přehledem literatury a popisem použitých experimentálních technik, jednak věnovat náležitou pozornost diskusi získaných dat, kterých je velké množství.

Po formální i věcné stránce mám připomínky k některým částem práce věnovaným rozptylovým metodám, do nichž se autorce vloudilo poněkud více chyb či formulačních nepřesností:

1) Str. 51: Rovnici (7) lze pro malé částice použít k odhadu gyračního poloměru, ale nejde o Guinierovu rovnici, která má tvar $\ln(I(s)/I(0)) = -R_g^2 s^2/3$. Rovnice (8) je zcela nesprávná. Veličina A v rovnici (10) není distribuční funkce relaxačních časů, jak uvádí autorka, nýbrž amplituda autokorelační funkce. V části týkající se dynamického rozptylu světla je popis poněkud zmatený, rovnice (9) a (11) jsou až na normalizaci stejné, a totéž tím pádem platí pro funkce $g(\tau)$ a $g^{(2)}(\tau)$.

2) Str. 53: Při rozptylu souboru náhodně orientovaných částic je radiálně symetrická nikoli rozptylová křivka, ale záznam na 2D detektoru (scattering pattern), jehož azimutálním zpřůměrováním se rozptylová křivka získá. Rovnice (14) platí jen při zanedbání interakcí mezi proteinovými molekulami, které by vedly k nutnosti zahrnout do vztahu i mezičásticové interference prostřednictvím strukturního faktoru.

3) Str. 84. Na obr. 5.38 má na ose y místo intenzity $I(t)$ být autokorelační funkce $g^{(2)}(\tau) - 1$.

4) Str. 85. Na obr. 5.39 má na ose y místo autokorelační funkce $g^{(2)}(\tau) - 1$ být veličina $\tau_R A(\tau_R)$, kde $A(\tau_R)$ je distribuční funkce relaxačních časů τ_R definovaná rovnicí (12).

Na autorku mám pak následující dotaz:

V diskusi na str. 88 jsou uvedeny hodnoty gyračního poloměru pro ASK1 a komplex ASK1:TRX získané z měření SAXS s komentářem, že komplex je tvarově více nesymetrický než volný protein ASK1. Jen z hodnot R_g ovšem nelze vyvozovat žádné informace o tvaru částice, stejně jako tak nelze činit za samotných hodnot maximálních vzdáleností párů, jak autorka činí níže. Je tento závěr vyvozen na základě srovnání poměrů R_g/D_{\max} nebo ještě při zahrnutí jiných parametrů získaných z rozptylové křivky?

Bc. Katarína Pšenáková ve své diplomové práci prokázala, že zvládla řadu experimentálních technik molekulární biologie i biofyzikální chemie a naučila se samostatně zpracovávat a hodnotit výsledky. Proto závěrem konstatuji, že její diplomová práce i přes drobné formální nedostatky splňuje všechna kritéria kladená na tento typ závěrečných prací, a proto ji plně doporučuji k obhajobě.

V Praze, 12. 5. 2015

Doc. RNDr. Miroslav Štěpánek, Ph.D.