

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci Mgr. Jany Škerlové nazvanou: „Understanding the interaction of antibodies and transcription factors with their ligands through structural biology“

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Jany Škerlové je zaměřena na studium struktury bakteriálních transkripčních faktorů a fragmentů protilátek cílených proti antigenům s možným terapeutickým využitím. Předložená disertační práce je založena na třech již publikovaných člancích a jednom rukopisu, který je nyní v recenzním řízení. Na všech člancích je Mgr. J. Škerlová první autorkou. Disertační práce je rozdělena na dvě části. Hlavním cílem první části práce, která je tvořena dvěma publikacemi, bylo objasnění molekulárního mechanismu funkce metabolického represoru DeoR z modelové bakterie *Bacillus subtilis*. Zde se autorce podařilo vykrytalizovat a následně vyřešit krystalovou strukturu domény vázající efektor tohoto represoru a to jak v její volné formě, tak i v komplexu s efektořem deoxyribosa-5-fosfátem. Vyřešená struktura ukázala, že interakce mezi represorem a efektořem je zprostředkována reversibilní kovalentní vazbou (Schiffovou bází) s postranním řetězcem lysinu ve vazebném místě. Na základě získaných strukturních dat a výsledků experimentů studujících oligomerní chování domény byl navržen model vysvětlující funkci DeoR. Cílem druhé části práce, která je založena na dalších dvou publikacích, byla optimalizace krystalizace rekombinantního fragmentu protilátky MEM-57 cílené proti antigenu CD3 a dále strukturní charakterizace interakce fragmentu protilátky MEM-85 s antigenem CD44. Autorka použila metodu diferenční skenovací fluorimetrie (DSF) ke studiu stability protilátky MEM-57 v puřech o různém složení a ukázala, že vhodným výběřem puřru lze výrazně zvýšit šanci na úspěšnou krystalizaci tohoto proteinu. V rámci studie zaměřené na interakci fragmentu protilátky MEM-85 s antigenem CD44 autorka pomocí NMR a mutační analýzy identifikovala aminokyselinové zbytky CD44 odpovědné za interakci s protilátkou. Dále na základě SAXS měření navrhla strukturní model komplexu, který naznačuje, že MEM-85 interaguje s C-terminální částí CD44 a jeho vazba indukuje konformační změnu podobnou té, kterou způsobuje vazba kyseliny hyaluronové.

Disertační práce Mgr. J. Škerlové je psána tzv. zkrácenou formou a obsahuje úvod do studované problematiky, cíle práce, výsledky ve formě tří publikovaných článků a jednoho rukopisu, diskusi, závěry a seznam citované literatury. Každý článek je uveden stručným souhrnem a přesným vymezením podílu doktorandky na dané práci. Práce je psána pěknou

angličtinou a z formálního hlediska je dle mého názoru vše v pořádku. Přítomnost gramatických chyb a formulačních nepřesností je minimální. Předložená disertační práce ukazuje, že Mgr. Jana Škerlová získala zkušenosti v celé šíři strukturní biochemie a seznámila s řadou klíčových technik včetně proteinové krystalografie, NMR a SAXS.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám následující dotazy, které jsou spíše náměty pro diskusi:

1. Ve své práci často používáte metodu DSF (diferenční skenovací fluorimetrii) pro studium stability proteinů v různých pufrch. Např. obr. 8 na str. 36 ukazuje příklad takového experimentu. Jaká je chyba odhadu T_m touto metodou?
2. V rámci studia struktury c-DeoR jste ukázala, že vazba efektoru dR5P je zprostředkována vytvořením Schiffovy báze s postranním řetězcem Lys141. Je něco známo o mechanismu disociace efektoru? Dochází v bakteriální buňce vůbec k disociaci dR5P z DeoR?
3. Porovnání struktur c-DeoR bez a s navázaným efektozem ukázalo změny v rámci dimerizačního povrchu a naznačilo možnost ovlivnění vzájemné interakce monomerů. Gelová permeační chromatografie však neukázala signifikantní změnu stability dimeru DeoR po navázání efektoru. Máte představu, jaké jsou hodnoty disociačních konstant dimerů c-DeoR a DeoR? Jaká byla koncentrace vzorků c-DeoR a DeoR analyzovaných pomocí GPC? Zkoušely jste sledovat stabilitu těchto dimerů i pomocí jiných metod?
4. Pro strukturní charakterizaci komplexu CD44 s MEM-85 byla použita kombinace NMR a SAXS. Zkoušeli jste tento komplex také krystalizovat?

Závěrem konstatuji:

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Jany Škerlové představuje cenný přínos ke studiu struktury bakteriálních transkripčních faktorů a komplexů monoklonálních protilátek s příslušnými antigeny. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, výsledky byly publikovány v kvalitních mezinárodních časopisech s IF. Autorka ve své disertační práci dokázala, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce.

Jelikož předložená práce Mgr. Jany Škerlové vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně ji **doporučuji** k přijetí.

V Praze 12. června 2015

prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Katedra fyz. a makromol. chemie
Přírodovědecká fakulta UK, Praha