

Posudek na disertační práci RNDr. Tomáše Ječmena s názvem

### **Cytochrome P-450: Study of structure and interactions using chemical modification, photo-initiated cross-linking and mass spectrometry**

Disertační práci jsem obdržel k posouzení jako vázaný výtisk. Práce je strukturovaná jako komentovaný soubor publikovaných článků ve vědeckých časopisech uvedených jako přílohy, kde je RNDr. Ječmen dvakrát prvním a dvakrát druhým autorem v pořadí. Bez těchto příloh je rozsah disertační práce celkem 53 číslovaných stran včetně přehledu literatury. Práce je psána anglicky, členění je obvyklé. Na úvod je zařazeno shrnutí v jazyce anglickém i českém, obsah, teorie související s experimentální částí včetně metodiky, cíle práce a výsledky s diskusí. Pak následuje závěr a seznam citované literatury. Jazyk práce je srozumitelný, i když jsou četné rezervy pro zlepšení, zejména v používání gramatických členů. Přijde mi, že v tomto ohledu je experimentální část zpracována lépe než část teoretická.

Tématem disertační práce bylo studium interakce králičího cytochromu P450 a cytochromu  $b_5$ , které jsou součástí oxygenasového systému se smíšenou funkcí v asociaci s membránou endoplazmatického retikula. Pro experimentální činnost bylo využito metod vytváření příčných vazeb (síťování) mezi blízkými částmi polypeptidových řetězců. Po proteolytickém štěpení byly peptidy obsahující příčnou vazbu analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie a takto získány informace o topologii interakcí.

Teoretická část shrnuje metodiku pro určování prostorové struktury proteinů, jako jsou rentgenová krystalografie, elektronová mikroskopie, nebo jaderná magnetická rezonance. Píše se o analýze proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) a jejích základních aspektech. Shrnuty jsou experimenty využívající MS v kombinaci s činidly pro vytvoření příčné vazby, ať už jde o tzv. molekulová pravítka („molecular rulers“), činidla pro vytváření příčné vazby v „nulové“ vzdálenosti („zero-length cross-linkers“) nebo činidla vyžadující pro tento účel fotoaktivaci vedoucí k radikálovým reakcím. V souladu s experimenty v rámci přípravy disertační práce jsou shrnuty možnosti vnesení netypických aminokyselin do aminokyselinové sekvence rekombinantních proteinů. Konečně je stručně rozebrána problematika cytochromu P450, mechanismus příslušné enzymové reakce a její význam. Text přináší množství informací a přitom je podán stručně a srozumitelně. V představené metodice studia struktury proteinů užitím MS ale postrádám zmínku o H/D izotopové výměně s pepsinovým štěpením, která přináší data o mobilitě struktur, a také bych uvítal shrnutí metodiky pro analýzu peptidových sekvencí, neboť i ta byla součástí vyhodnocování experimentů. Autor by toto téma mohl komentovat při obhajobě.

Cíle práce jsou jasně specifikovány – připravit rekombinantní cytochrom  $b_5$  s inkorporovaným reaktivním analogem methioninu a tento protein pak využít ke studiu vzájemné interakce s cytochromem P-450 2B4 pomocí reakcí vedoucích k tvorbě příčných vazeb s následující identifikace propojených peptidových úseků hmotnostní spektrometrií.

Experimentální část disertační práce shrnuje optimalizaci produkce rekombinantního cytochromu  $b_5$  za účelem dosažení maximálního procenta inkorporace fotoaktivovatelného analogu pMet. Byly rovněž připraveny mutantní proteiny vždy s jedním kódovaným methioninovým zbytkem, kde se inkorporoval pMet. Interakce cytochromu P450 2B4 a cytochromu  $b_5$  byla fixována vytvořením příčných vazeb, a to užitím činidla EDC pro informace o interakci katalytických domén a radikálovou reakcí prostřednictvím

světlem aktivovaného pMet. Vytvořené zesíťované komplexy obou proteinů (více variant daných stechiometrií) byly separovány gelovou elektroforézou a podrobeny proteolytickému štěpení a MS analýze peptidů s příčnou vazbou. Z výsledků bylo možné odvodit tři typy rozdílných interakcí, ke kterým dochází podle orientace cytochromu P450. Interakce byly vizualizovány postupy molekulového modelování. Nalezeny byly i intramolekulové příčné vazby v rámci cytochromu  $b_5$ . Stechiometrie proteinových komplexů byla v jednom případě podrobena studiu pomocí analýzy aminokyselinového složení.

K této části práce mám následující dotazy:

- 1) Proč nebyla pro vytvoření příčných vazeb vyzkoušena i další činidla, zejména z kategorie „molecular rulers“? Minimálně lysinové a karboxylátové zbytky jsou v sekvenci cytochromu  $b_5$  k dispozici v dostatečném počtu. Bylo by tak jistě možné získat více vzdálenostních informací.
- 2) Na str. 36 je komentováno, že peptidy s příčnými vazbami nebyly analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií kvůli nízkému výtěžku. Nebylo možné spojením digestů („poolováním“) z více pásů z elektroforetického gelu tento nedostatek překonat? Je samořejmě do jisté míry škoda, že výsledky tohoto druhu nejsou prezentovány.
- 3) K analýze stechiometrie proteinového komplexu (str. 41-42); bylo by možné obsah peptidů pocházejících např. z cytochromu  $b_5$  kvantifikovat na základě přídavku digestu značeného monomerního standardu, a to i použitím MALDI-MS? Tím značením myslím např. pomocí izotopu  $^{18}\text{O}$  inkorporovaného do peptidů v digestu během trypsinového štěpení v  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ .

Mohu konstatovat, že autor prokázal schopnost kritické práce s odbornou literaturou, samostatné plánování a provádění laboratorních experimentů, včetně jejich vyhodnocení a diskutování. Splnil tak předpoklady, které jsou nutné k vypracování vědeckého spisu. Nedílnou součástí celku disertační práce je i publikační aktivita autora v recenzovaných vědeckých časopisech. Závěrem mého posudku je tak doporučení disertační práce k obhajobě před odbornou komisí.

Ve Vídni dne 12. 6. 2015

Marek Šebela