

## Posudek na disertační práci **Mgr. Renaty Ptáčkové**

### **Aplikační potenciál modifikačních metod (chemická činidla, foto-nanosondy) a hmotnostní spektrometrie pro studium struktury proteinů a jejich vzájemných vztahů**

Předkládaná disertační práce se zabývá studiem struktury a zejména interakcí proteinových komplexů s využitím síťovacích technik v kombinaci s hmotnostně-spektrometrickou analýzou. Zaměřuje se především na novou síťovací techniku – *in vivo* inkorporaci foto-aktivovatelných analogů aminokyselin do sekvence studovaného proteinu během rekombinantní exprese v bakteriálních buňkách. Konkrétně jde o foto-aktivovatelný analog methioninu. V první části práce se doktorandka zabývá optimalizací této metody a následně její aplikací na studium interakce mezi podjednotkami lidského regulačního proteinu 14-3-3zeta.

Další část práce se věnuje strukturně funkčnímu studiu biotransformačních enzymů - systému oxygenas se smíšenou funkcí. Tyto enzymy hrají klíčovou roli v metabolismu xenobiotik v lidském organismu. Jejich studium má tedy velký význam. Technika síťování pomocí foto-aktivovatelného methioninu, společně ještě s metodou chemického síťování pomocí EDC a hmotnostní spektrometrie, byla využita k charakterizaci membránového komplexu králičího cytochromu P450 2B4 s cytochromem b<sub>5</sub> a určení stechiometrie vytvořených oligomerních komplexů.

Lze tedy jednoznačně konstatovat, že téma disertační práce bylo zvoleno vhodně, jelikož studium protein-proteinových interakcí za nativních podmínek má velký význam. Protože znalost prostorového uspořádání proteinů je nezbytná k pochopení jejich funkce. Uplatnění této metody při studiu nejrůznějších proteinů může přispět k objasnění regulačního mechanismu mnoha buněčných procesů.

Úvod práce je prezentován čtivou formou včetně názorných obrázků a odkazů na literaturu i předchozí práce školitele a spolupracovníků. Čtenář je uveden do problematiky studia struktury proteinů. Oceňuji zejména, že jednotlivé metody jsou srozumitelně popsány, včetně uvedení jejich možných aplikací, výhod a záporů. Cíle práce jsou jasně definovány, vyplývají z informací v úvodní části a navržený postup je v souladu se současnými trendy výzkumu v této oblasti. Výsledková část je rozdělena na čtyři dobře se doplňující kapitoly s komentáři ke třem článkům publikovaných v recenzovaných časopisech. Závěry jsou jasně formulovány a zcela odpovídají dosaženým výsledkům. Mezi hlavní a originální výsledky patří:

- 1) optimalizace inkorporace foto-aktivovatelného methioninu do sekvence 14-3-3zeta proteinu a identifikace nových kontaktů mezi aminokyselinami v doméně homodimeru tohoto proteinu
- 2) identifikace dvou možných orientací katalytických domén cytochromů P450 2B4 a cyt b<sub>5</sub> a stanovení jejich molárních poměrů v komplexu

Disertační práce je doplněna seznamem literatury a jednotlivými články ve formě přílohy. Zde je také u každé publikace krátké vyjádření k podílu doktorandky na dané publikaci. Tento podíl je ve všech případech významný a zřetelně zdůvodňuje postavení doktorandky v pořadí autorů. Práce působí uceleně, je pečlivě zpracována po stránce faktické i formální. Také autoreferát je vypracován pečlivě a splňuje svoji funkci.

K práci mám následující otázky:

- 1) Jak by podle Vašeho názoru vypadala situace u lidských orthologů cytochromů P450 2B4 a cyt b5? Očekávala byste obdobné výsledky z hlediska orientace katalytických domén a molárních poměrů obou enzymů?
- 2) Můžete shrnout, proč právě methionin byl vybrán jako ideální aminokyselina pro danou techniku síťování? Zkoušeli jste k tomu využít i jiné aminokyseliny? V práci zmiňujete leucin.
- 3) Liší se podle Vašeho názoru molární poměr mezi cytochromem b5 a cytochromy P450 v rámci jedné podrodiny cytochromů P450? (*Mohl by být v rámci celé jedné podrodiny cytochromů P450 molární poměr s cytochromem b5 obdobný nebo je to čistě věc každého jednotlivého enzymu?*)

**Předložená disertační práce dle mého názoru splnila svůj účel, protože autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem a uveřejněným článkům v mezinárodních recenzovaných časopisech plně doporučuji doktorskou práci Mgr. Renaty Ptáčkové přijmout k obhajobě.**

V Praze dne 23.12.2014

RNDr. Kateřina Levová, Ph.D.