

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic

Jan Konvalinka PhD
Proteases of Human Pathogens
Flemingovo n. 2
166 10 Praha 6
Czech Republic

Telephone +420 220183 218
fax +420 220 183 578
e-mail konval@uochb.cas.cz

14.5. 2008

Oponentský posudek

Interakce adenylát cyklasového toxinu s komplementovým receptorem 3 –
vztah struktury a funkce

Doktorská disertační práce

Mgr. Jana Morová
Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů
MBÚ AV ČR

Mgr. Jana Morová předkládá disertační práci, vypracovanou v Laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ AV ČR. Práce má 143 stran plus dvě přílohy, zahrnující publikované práce Mgr. Morové.

Autorka ve své disertační práci popisuje přípravu rekombinantní integrinové podjednotky CD11b v *E. coli*, pokus o expresi integrinu CD11b/CD18 v buňkách S2 z *Drosophily* a možné využití schopnosti adenylát cyklasového proteinu internalisovat se do buňky k cílené dopravě epitopů do antigen prezentujících buněk. Za nejdůležitější výsledek předkládané disertace považuju zjištění, že vazba na cílovou buňku a její likvidace CyaA vyžaduje N-glykosylaci beta-integrinových receptorů a že může být inhibována jednoduchými cukry, které jsou stavebními kameny příslušných N-glykosidů. Tento výsledek byl publikován v práci přijaté letos v dubnu do *Proc. Natl. Acad. Sci.* a autorce je třeba k tomuto skvělému publikačnímu úspěchu pográtulovat.

Práci sl. Morové samozřejmě usnadnila skutečnost, že ji provedla ve špičkové evropské laboratoři, která na tématu molekulární biologie bakteriálních patogenů vybudovala celou vědeckou školu; výběr laboratoře a školitele je ostatně nezbytnou podmínkou úspěchu každé disertace a i zde je třeba kandidátce k výběru pográtulovat.

Disertantka v předkládané práci prokazuje, že si velmi dobře osvojila značnou škálu experimentálních technik, od klonování rekombinantní DNA, exprese a purifikace rekombinantních proteinů až po některé imunologické techniky a studium protein-proteinových interakcí. Současně potvrzuje schopnost racionálně experimenty analyzovat a střízlivě zhodnotit jejich výsledky.

V práci jsem našel jen velmi málo věcných nebo formálních nedostatků (většinou chybějících čárek ve větách nebo zadržávající odborné češtiny, někdy lopotných překladů anglických termínů), kterými nebudu obtěžovat. Z formálního hlediska bych snad jen upozornil, že citace se v (bio)chemické literatuře uvádějí zásadně se všemi autory (viz časté „*et al.*“ v seznamu literatury, čítajícím úctyhodných 321 citací). Obecně musím konstatovat, že po dlouhé době rád vidím „klasickou“ plnoformátovou disertační práci psanou v češtině s úvodem, cíli, metodickou částí, výsledky a diskusí. Úvod je velmi přehledný a srozumitelný, s potěšením jsem si jej přečetl jako výborný úvod do zajímavé problematiky. Autorce stálo pečlivé vypracování celé práce jisto mnoho úsilí, které se však určitě vyplatí při použití tohoto textu jako příručky pro nově nastupující studenty a spolupracovníky laboratoře.

Jako podklad pro diskusi bych disertantce rád položil následující otázky:

1/ kandidátka uvádí jako příčinu nízké účinnosti purifikace extracelulární domény podjednotky CD11b v *E. coli* asociaci proteinu s membránami, a problém řeší expresí čtyř fragmentů téhož proteinu, rovněž v *E. coli*. Tuto strategii popisuje jako „účinnou“, ale v textu jsem nenašel kvantifikované výtěžky ani purifikační tabulku. Jaké byly tedy výtěžky rekombinantních proteinů při aplikaci tohoto postupu?

2/ exprese rekombinantního proteinu CD11b nebo jeho extracelulární části v S2 buňkách se nepodařila, což je při práci s rekombinantními glykosylovanými proteiny bohužel častý případ. Popravdě řečeno, první nebo druhá použitá strategie funguje jen málokdy, obvykle je třeba mnohem většího počtu pokusů. Pokoušela se kandidátka použít jiné strategie (fúzní proteiny jako MBP nebo GST, exprese v bakulovirech, aj.)? Je o alternativách něco známo v literatuře?

3/ objev specifické interakce sacharidových zbytků s CyaA je samozřejmě nesmírně zajímavý nejen pro biochemii tohoto bakteriálního pathogenu, ale obecně jako příklad

protein-sacharidové interakce. Bylo by velmi zajímavé pokusit se o strukturní charakterisaci této interakce (X-ray komplex CyaA nebo jeho fragmentu s fragmentem integrinu, případně oligosacharidem). Probíhají už v tomto smyslu nějaké experimenty?

Na závěr s potěšením konstatuji, že předložená disertační práce je vynikající i podle mezinárodních měřítek, svrchovaně naplňuje požadavky příslušných zákonných ustanovení a plně ji proto doporučuji k obhajobě.

Jan Konvalinka