



RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.  
Oddělení Proteinových struktur  
Fyziologický ústav AVČR, v.v.i.  
detašované pracoviště BIOCEV  
Průmyslová 595  
25250 Vestec  
Tel.: +420 325873513  
Email: veronika.obsilova@fgu.cas.cz

Oponentský posudek na práci

**Targeted modifications of the protein-protein interactions: Ternary complex of interferon- $\gamma$  as a model system**

Autor práce: Mgr. Jiří Zahradník

Předkládaná disertační práce Mgr. Jiřího Zahradníka se zabývá vývojem nových přístupů v oblasti modulací protein-proteinových interakcí, kdy byl jako modelový systém použit IFN- $\gamma$  a jeho receptory IFN- $\gamma$ R1 a IFN- $\gamma$ R2. Výzkum je zaměřen zejména na nedostatečně prozkoumaný mechanismus IFN- $\gamma$ R2, tvorbu ternárního komplexu IFN- $\gamma$ /R1/R2 a evoluci komplexu. Disertační práce vznikla v Laboratoři biomolekulárního rozpoznávání Biotechnologického ústavu AVČR, v.v.i. pod vedením prof. Ing. Bohdana Schneidera, CS.c.

Práce je psána zkrácenou formou a je členěna do obvyklých částí zahrnující Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Výsledky a diskuze, Závěr, Reference. Kopie tří publikací, které tvoří základ disertační práce Mgr. Jiřího Zahradníka, jsou uvedené formou přílohy, rovněž jsou přiloženy závěry ze čtvrté připravované práce. Všechny tři experimentální práce byly publikovány v kvalitních mezinárodních časopisech s IF. Na publikaci v časopise *Fish & Shellfish Immunology* je Mgr. Jiří Zahradník první autor. Na další publikaci v časopise *Acta Crystallographica D-Structural Biology* je pak sdílený první autor. U třetí publikace v časopise *Biomed Research International* je pak součástí kolektivu autorů. Na čtvrté připravované publikaci je pak opět prvním autorem.

Práce je psána anglicky, formální úroveň a grafické zpracování je vynikající. Autor v literárním přehledu detailně popisuje úlohu interferonů a cytokinových receptorů. V úvodu nechybí velmi pěkné ilustrace, které usnadňují pochopit popisovanou problematiku. Všechny použité literární zdroje jsou řádně citovány. V předkládané práci je vytčeno několik cílů. První část výsledků zahrnuje studium efektů mutací v receptorových kavitách s cílem modulovat afinitu mezi IFN- $\gamma$ R1 a IFN- $\gamma$ . Další část výsledků se zabývá vyřešením krystalové struktury IFN- $\gamma$ R2 receptoru, která byla vyřešena s rozlišením 1.8 Å. Třetí část výsledků zahrnuje podrobnou fylogenetickou analýzu IFN- $\gamma$  a jeho receptorů u rybích proteinů, v rámci které se podařilo vykristalizovat IFN- $\gamma$  z platýze a vyřešit strukturu s rozlišením 2.3 Å. Jedinou drobnou výtkou je, že poslední část práce zabývající se topologií ternárního komplexu IFN- $\gamma$ , je zbytečně stručná.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám několik dotazů:

- 1) Pro expresi IFN- $\gamma$ R2 byly použity hmyzí S2 buňky, nezkoušel jste použít PROSS server pro návrh stabilnější varianty pro expresi v bakteriích? Naproti tomu IFN- $\gamma$  jste dokázal produkovat v bakteriích v kmeni Rosetta(DE3). Můžete komentovat, jak náročná byla optimalizace exprese, purifikace a krystalizace obou proteinů? K vyřešení obou krystalových struktur byla použita metoda molekulárního nahrazení či některá z metod experimentálního fázování?
- 2) Můžete v krátkosti shrnout princip duálního luciferázového reporterového systému, který byl použit pro určení vazebného rozhraní IFN- $\gamma$ R2? Jaký je význam mutací kyseliny asparagové na lysin či arginin (strana 33)? Mutace na pěti pozicích významně ovlivnily aktivitu IFN- $\gamma$ R2 v kompetiční eseji. Jak jste ověřili, že dané mutace neovlivnily strukturu IFN- $\gamma$ R2 receptoru?
- 3) SEC-SAXS technika byla použita z důvodu velké koncentrační závislosti měřených vzorků ternárního komplexu IFN- $\gamma$ . Tato metoda je neocenitelná zejména pro zkoumání heterogenních systémů, ale procesování dat pak včetně analýzy překrývajících se píků pak není úplně přímočarou záležitostí. Jak byla zajištěna kontrola nad stechiometrií ternárního komplexu? Jaký program byl použit pro rigid-body modelování? Jak vypadá normalizovaný Kratky plot pro ternární komplex a co to naznačuje?
- 4) Jaký je současný stav práce týkající se topologie ternárních komplexů připravované k tisku?

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Jiřího Zahradníka představuje cenný přínos pro lepší pochopení regulace a funkce v ternárním komplexu IFN- $\gamma$  s receptory IFN- $\gamma$ R1 a IFN- $\gamma$ R2. Je zřejmé, že si kandidát při řešení vytčených cílů osvojil řadu velmi sofistikovaných biofyzikálních technik, především metody SPR, krystalografii a SAXS, metody molekulární biologie a bioinformatiky. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, výsledky byly publikovány v kvalitních mezinárodních časopisech. Výsledky práce jsou dobře diskutovány a dávány do souvislostí. Autor ve své disertační práci prokázal, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce. Předkládaná disertační práce splňuje všechny požadavky studijního programu Biochemie, a proto ji plně doporučuji k obhajobě. Současně přeji Mgr. Zahradníkovi hodně úspěchů v dalším profesním i osobním životě.

V Praze dne 27. 8. 2018

RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.