



Oponentský posudek

na doktorskou dizertační práci Mgr. Jiřího Zahradníka

„Targeted modifications of the protein-protein interactions: Ternary complex of interferon- γ as a model system“

Předkládaná dizertační práce byla vypracována na Biotechnologickém ústavu AV ČR, v.v.i. v Laboratoři biomolekulárního rozpoznávání pod odborným vedením doc. Ing. Bohdana Schneidera, CSc. Je psána v anglickém jazyce na 56 stranách textu, včetně životopisu kandidáta na titul PhD., a dále obsahuje 34 stran příloh, což jsou tři příložené publikace tvořící odborný základ práce. Všechny publikace jsou ve formátu článků přijatých do recenzovaných časopisů, na jedné z nich je kandidát prvním autorem, na další sdílí prvoautorství s kolegou Dr. Mikuleckým.

Práce je vyhotovena v pro mě poněkud neklasickém členění, kdy po úvodu do problematiky a vytyčení cílů práce následuje kombinovaná sekce výsledky a diskuze. Ta čtenáře ve třech kapitolách provede výsledky prezentovanými v plném rozsahu v daných publikacích a v poslední kapitole se autor věnuje dosud nepublikovaným dílčím výsledkům týkajících se stavby ternárního komplexu interferonu gama s jeho oběma receptory. Tato poslední kapitola je však příliš stručná a prezentované výsledky, zejména strukturní modely získané pomocí metody SAXS, jsou poněkud vytržené z kontextu, resp. zasloužily by důkladnější popis, který by čtenáři umožnil jejich lepší pochopení. K práci by tak ideálně buď měl být přiložen i rukopis připravované publikace, který by tyto výsledky rozvedl v plné šíři, anebo by možná lépe měly skutečně tvořit pouze samostatnou diskuzi dalšího navazujícího výzkumu.

Tato drobná výtka však nijak nesnižuje odbornou úroveň práce, která je vynikající (a to i po formální a grafické stránce), a jak je z autorova životopisu a seznamu publikací patrné, měl by dostatek materiálu i na druhou dizertaci v oboru mikrobiologie, včetně dvou dalších publikací, kde je prvním autorem. Během svého doktorského studia se zvládl prakticky seznámit s velkou řadou technik, od heterologní exprese proteinů, přes jejich biofyzikální charakterizaci a řešení struktury, až po bioinformatiku a výpočetní modelování. Věřím, že mu nabyté zkušenosti dobře poslouží v jeho současném působišti v Izraeli a přeji mu mnoho úspěchů a vědeckých objevů plných nadšení.

Jako podklad pro diskuzi bych dizertantovi rád položil následující doplňující otázky:

1. Zaujalo mě, jakým způsobem jste přistoupil k určení vazebného místa na povrchu IFN- γ R2. Intuitivně bych předpokládal, že vazebné místo bude napříč všemi 90 porovnávanými geny tvořit do jisté míry konzervovanou sekvenci, z hlediska zachování funkce receptoru, zatímco ostatní aminokyseliny budou více variabilní (v rámci možností zachování celkově obdobného tvaru molekuly receptoru). Dle vašich pozorování je tomu však právě naopak. Můžete vysvětlit, jak je možné, že vazebné místo tvoří nejvíce proměnlivou část receptoru? Odpovídá to variabilitě IFN- γ a IFN- γ R1 mezi těmito 90 druhy? Přinejmenším IFN- γ se jeví jako strukturně poměrně konzervovaná molekula (viz obr. 1.2A, str. 6).
2. Vámi studovaný IFN- γ R2 je lidského původu – neuvažovali jste o jeho expresi přímo v lidské buněčné linii, např. HEK293, s využitím sekrece do média? Pro úspěšnou krystalizaci Vámi připraveného IFN- γ R2 bylo nutné protein deglykosylovat, což je však u proteinů exprimovaných v hmyzích buněčných liniích obtížné až nemožné, na rozdíl od linie HEK293. Co soudíte o vlivu posttranslačních modifikací na uspořádání ternárního komplexu?
3. Můžete prosím vysvětlit vznik obrázku 3.4B(a) na str. 35? Pochopil jsem dobře, že byl metodou SEC-SAXS analyzován celý ternární komplex a z vybraných dat odpovídajících očekávanému komplexu byla modelována obálka, do níž byl vložen binární komplex a jejíž zbylá část přisouzena navázanému IFN- γ R2? Bylo by možné ukázat obálku pro celý komplex, tzn. posoudit, nakolik jednoznačné je vložení binárního komplexu? Pokusili jste se to zbylé části obálky vložit IFN- γ R2? A odpovídá poté jeho vazebné místo onomu Vámi předpovědanému (viz první otázka)?

Studiu receptoru pro IFN- γ je v laboratoři doc. Schneidera věnována dlouhodobá pozornost a troufám si tvrdit, že výsledky předkládané práce posunuly tento výzkum o velký kus dopředu. Zásadní význam má z mého pohledu zvládnutí heterologní exprese IFN- γ R2 a vyřešení jeho struktury, a věřím, že se toto úsilí zúročí při dalším studiu ternárního komplexu. Závěrem s potěšením konstatuji, že předložená dizertační práce je zdařilým dílem. Jejím vypracováním prokázal Mgr. Jiří Zahradník velké tvůrčí schopnosti a znalosti a rovněž tak schopnost samostatné vědecké práce. Práce naplňuje požadavky studijního programu Biochemie a plně ji doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 5. 9. 2018



RNDr. Ondřej Vaněk, PhD.