Oponentský posudek na doktorskou dizertační práci Mgr. Rozálie Hexnerové

Mgr. Rozálie Hexnerová předložila k obhajobě svoji dizertační práci s názvem „Structural NMR studies of protein complexes“ ve formě komentovaného souboru výsledků, které byly již publikovány v recenzovaných mezinárodních periodikách. Autorka vypracovala svojí práci pod vedením Ing. Václava Veverky, Ph.D. na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecké fakulty University Karlovy a Ústavu organické chemie a biochemie, AVČR. Konzultantem práce byl RNDr. Zdeněk Tošner, Ph.D.

Práce je napsána v anglickém jazyce a obsahuje 169 stran textu, včetně kopií tří publikovaných článků, jejichž výsledky jsou předmětem této dizertace. Tématem práce jsou strukturní studie tří biologicky aktivních systémů pomocí spektroskopie nukleární magnetické rezonance. Nutno dodat, že Mgr. Hexnerová je, kromě výše zmíněných tří článků, spoluautorkou dalších šesti publikací, jejichž citace jsou v práci též zmíněny.

Jak jsem již předeslal v úvodu, dizertační práce je napsána anglicky a nutno dodat, že styl a jazyk práce jsou na velmi vysoké úrovni. Práce je bez gramatických chyb a překlepů a jen u několika málo obratů jsem musel přemýšlet, co tím autorka chtěla vyjádřit. Všechny výše zmíněné atributy přispívají k velmi dobrému pocitu čtenáře při čtení této práce.

Do úvodní kapitoly zařadila autorka stručný popis základů NMR spektroskopie a využití této metody ve strukturních studiích proteinů, spolu s představením všech studovaných systémů. Tato část je zpracována velmi pečlivě a je podpořena názornými obrázky. Malou připomínku zasluhuje poměrně velké množství zkratek, ve kterých se čtenář může občas ztratit. Na druhou stranu uznávám, že všechny zkratky představují oficiální názvy (identifikace) molekul v popisovaných systémech a bez jejich využití by byla práce mnohem méně přehledná. Možná by jen nebylo od věci připojit ke každé kapitole jejich výčet.

Kapitola o výsledcích je členěna podle již zmíněných tří systémů, jejichž studiu se autorka věnovala. Každá část je uvedena autorčinou motivací ke studiu příslušného systému. Vzhledem k tomu, že na každém ze zmiňovaných projektů pracovalo více lidí, je na začátku každé kapitoly ještě zmínka o konkrétním příspěvku dizertantky, což velmi oceňuji. Samotné výsledky jsou popsány stručně a výstižně, a pokud se čtenář zajímá o detaily, je odkázán na originální články, které jsou součásti práce Vzhledem k tomu, že výsledky již prošly důkladným recenzním řízením, je moje úloha značně zjednodušená. K práci mám následující dotazy a připomínky:

str. 15: U gyromagnetické konstanty chybí jednotky

str. 21: Zde je poněkud nepřesný popis metody nazvané „CPMG relaxation dispersion“. Text, který je zde uveden, je vysvětlením jednoduché metody CPMG, tj. metody měření spin-spinové relaxační rychlosti R_2 a nikoliv „CPMG relaxation dispersion“, která využívá fenoménu chemické výměny a dovoluje tak detekci konformačních stavů o nízké populaci

str. 22: Nepochopil jsem, co je míněno větou: “RDC make advantage of chemical shift anisotropy“. Prosím autorku o bližší vysvětlení

str. 30: Zde jsou prohozené barvy v jednotlivých panelech

Dotaz č. 1: Na obrázku 21 jsou ^{1}H spektra IGF-II proteinu, jednak korektně poskládaného, ale též proteinu s nesprávným skladem. Zajímalo by mě, jak bylo dosaženo právě toho nesprávného skladu?

Dotaz č. 2: Je evidentní, že IGF-II není ve volném stavu monomerem. Nezkoušeli jste nějak blíže charakterizovat tento stav, např. o jaký oligomer se jedná, jako tomu bylo kdysi v případě inzulinu?

Dotaz č. 3: Dneska je naprosto běžné ve strukturních studiích využití residuálních interakčních konstant (RDC), které prokazatelně vedou ke zlepšení kvality výsledných struktur. Ve vašem případě jsem nezaznamenal využití tohoto parametru, má toto nějaký konkrétní důvod, např., že jste měla dostatek ostatních experimentálních omezení nebo se vám nepodařilo nalézt vhodné experimentální uspořádání?

Dotaz č. 4: Tento dotaz se týká srovnání komplexů CAS-SH3 s Vinculinem, případně PTP-PEST peptidem a jejich chimér. Vy zmiňujete, že ^{1}H-^{15}N HSQC spektra komplexů a chimér byla velmi podobná, takže bylo možné použít chiméry pro strukturní studie. U obou spekter je však celá řada odlišných píků. Rozumím tomu dobře, když si myslím, že všechny tyto píky byly přiřazeny částem chimér, které byly tvořeny těmi připojenými peptidy? Také je zde zmíněno, že byl použit linker, který byl tvořen glyciny a seriny. Serin není úplně indiferentní aminokyselinový zbytek. Nedocházelo tak k nějakým nežádoucím interakcím této spojky s SH3 doménou?

Zmíněné poznámky a výtky naprosto nesnižují kvalitu této disertační práce, která je velmi zdařilým dílem. Jejím vypracováním prokázala Mgr. Rozálie Hexnerová značné tvůrčí schopnosti a znalosti a nelze, než doporučit komisi pro obhajoby disertačních prací, aby její disertační práci přijala jako podklad pro udělení vědecké hodnosti Ph.D.

V Praze, dne 27.11.2019 prof. Ing. Richard Hrabal, CSc.