

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Lucie Marečkové

Lucie Marečková vypracovala svou diplomovou práci „Sekretované proteázy kvasinky *Candida parapsilosis*“ pod vedením ing. Jiřího Dostála, PhD. na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Práce se zabývá strukturní charakterizací dvou sekretovaných aspartátových proteáz z *Candida parapsilosis* a jejich srovnáním, stejně jako interakcí těchto dvou proteáz z vybranými inhibitory. Práce chtěla přispět k bližšímu pochopení mechanismů substrátové specifity aspartátových proteáz, které jsou pravděpodobně i virulentními faktory *Candida parapsilosis*. Výsledky této diplomové práce by tak mohly sloužit také jako základ pro vývoj nových inhibitorů infekcí způsobených touto kvasinkou. Práce má tradiční členění, pouze kapitoly výsledky a diskuze se autorka rozhodla spojit v jeden celek. Práce navíc obsahuje i přílohy, které obrazově dokumentují úspěšné krystalizační podmínky a srovnání vazby inhibitorů do proteáz. Cíle diplomové práce je velmi ambiciózní, jejich splnění by, soudím, hravě stačilo na obhájení disertační práce. Cíle jsou opět napsány výstižně a motivují k přečtení celé práce. Literární úvod je prakticky vyčerpávající, velmi přehledný a výstižný. Obdobně nemám žádných výhrad ke kapitole metody a materiál. Snad bych jen některé části týkající se se určení struktur také převedl do metod, ale to je jen moje subjektivní hledisko, rozhodně nejde o výtku. Práce obsahuje celé a obdivuhodné spektrum pokročilých purifikačních i jiných metod proteinové biologie.

V kapitole výsledky a diskuze autorka shrnuje svou experimentální práci. Na začátek je třeba uvést a podtrhnout, že autorka splnila všechny cíle, které si v práci vytkla, byť s částí, která se týká sběru a interpretace strukturních dat získala významnou asistenci od Dr. Jiřího Bryndy. Výsledkem předkládané práce je osm 3D struktur, v jednom případě struktury proteinu, který dosud neměl určenou strukturu. O

kvalitě autorčiny práce mimo jiné svědčí i to, že většina struktur má velmi vysoké rozlišení. V případě struktury proteinu Sapp2p jde o dokonce o strukturu, která se rozlišením řadí mezi nejlepších 60 v databázi PDB. Autorka poprvé popsala strukturní rozdíly mezi studovanými proteázami a blíže charakterizovala i efekt alternativního čtení kodonu CUG. V kapitole výsledky a diskuze mi trochu chyběla diskuze, či přesněji obsáhlejší diskuze. V této kapitola prakticky chybí odkazy na literaturu, což nesvědčí o podrobné konfrontaci výsledků s dosavadními poznatky. U srovnávání struktur v kapitole 6.2.2 není uvedena metoda, která ke srovnání struktur sloužila. Ostatně soudím, že srovnávání struktur mohlo být využito více, např. při popisu rozdílů mezi dvěma studovanými proteázami. Diskuzi považuji za nevyužitou příležitost. Autorka získala fenomenální množství zajímavých výsledků, ale jako by je nechtěla příliš rozmazávat.

Práce je psaná hezkou, svižnou češtinou a prakticky neobsahuje překlepy. Autorka se sympaticky, a po mém soudu úspěšně, snaží nacházet české ekvivalenty pro metody, které jsou dobře usazené v odborné anglické terminologii, ale v češtině se s nimi našinec běžně neseťká (např. molecular replacement – molekulové nahrazení). Přesto však autorka výjimečně použila i počeštěného anglického termínu (např. „prvního píku chromatofokuse“). Kvalita obrazové dokumentace je příkladná – grafy, tabulky i obrázky mají popisky, měřítka a jednotky, pouze mi občas nebylo zřejmé, proč jsou dva obrázky, které spolu moc nesouvisejí, spojeny pod jedním číslem, zvláště když se vyskytují na dvou stranách (obr. 15). Obrázek 9 je v textu zmíněn až po obrázcích 10 a 11, přestože se objevuje před nimi. Práce obsahuje velké množství odkazů na relevantní literaturu, formát referencí je však značně nejednotný a v některých případech i neúplný (např. hned u první citace nejsou uvedeni všichni spoluautoři a chybí také název časopisu, číslo a stránkování. U krystalografických metod chybí citace.

Celkově by však nemělo zaniknout, že jde z hlediska množství

odvedené práce, použitých metodik i získaných výsledků o zcela nadprůměrnou práci, kterou jen trochu (a na slovu trochu jen v této větě důraz) kazí formální nedostatky. Práci proto jednoznačně doporučuji k obhájení.

K práci mám následující otázky:

Jsou popisované struktury uloženy v PDB? Plánujete je případně uložit i se „structure factors“?

Jak moc jste se podílela na samotném určení struktur od fáze sběru dat?

Pokoušeli jste se určit strukturu obou proteáz v apo formě, bez přítomnosti inhibitorů?

Dá se očekávat větší strukturní změna při přechodu z volné do formy vázající inhibitor?

Jakým přístrojem jste ověřovali kvalitu krystalů „u Vás doma“ v Dejvicích?

Krystaly jsou skutečně krásné. Který z nich byl největší? A jak trvanlivé byly krystaly na synchrotronu v proudu rentgenového záření?

Dal by se některý z použitých inhibitorů použít i v klinické praxi? Lze ze získaných výsledků odvodit, kterým směrem by se měl vyvíjet případný vývoj nových inhibitorů těchto proteáz?

Pokoušíte se určit i strukturu poslední proteázy z kvasinky *Candida parapsilosis*?

3.5. 2012 v Praze

