

Daniel Rozbeský PhD
Division of Structural Biology
University of Oxford
Roosevelt Drive
Oxford OX3 7BN



Tel: +44 1865 287723
email: daniel@strubi.ox.ac.uk

Oponentský posudek na práci

Characterization of protein structures using chemical cross-linking and mass spectrometry

Doktorská disertační práce
Mgr. Zdeněk Kukačka

V předložené disertační práci se Zdeněk Kukačka zabývá vývojem metody pro sledování konformačních změn proteinů pomocí chemického síťování ve spojení s hmotnostní spektrometrií a dále strukturní analýzou proteinových komplexů pomocí chemického síťování a vodík/deuteriové výměny. Disertační práce byla vypracována na katedře biochemie PřF UK a na Mikrobiologickém ústavu AV ČR pod vedením RNDr. Petra Nováka, PhD.

Práce je vypracována jako souhrn tří publikací, na nichž měl disertant zjevně významný autorský podíl, který je v disertaci přehledně a srozumitelně uveden. Úvodní souhrn je vypracován v obvyklém členění (úvod, cíle práce, materiály a metody, výsledky a diskuse a závěr), a k němu jsou formou příloh přičleněny tři práce, které tvoří vlastní obsah disertace, a které byly publikovány v solidních oborových časopisech. U jedné z nich je kandidát prvním autorem, a i u dalších je jeho autorský podíl nepochybný. Zdeněk Kukačka je spoluautorem dalších čtyř prací, které do této disertační práce nebyly zařazeny.

Práce je obsahově dobře koncipována. V úvodu autor stručně porovnává výhody a nevýhody metod, které jsou běžně používány pro studium struktury proteinů, dále následuje technický popis základních principů hmotnostní spektrometrie a popis základních metod hmotnostní spektrometrie, které jsou používány ve strukturní biologii. Kapitola chemického síťování, která je těžištěm celé práce, je dle mého názoru příliš stručná a absentují v ní současnější citace a návazná autorova kritická analýza se sdělením jeho vlastního názoru na stav poznání.

V kapitole Výsledky a diskuse, autor předkládá sérii prací, které spojuje studium struktury proteinů pomocí chemického síťování. V první práci, na které měl disertant značný podíl, je popsán vývoj metody pro studium konformačních změn proteinů pomocí deuterovaných a nedeuterovaných síťovacích činidel a následná aplikace metody na modelový protein kalmodulin. Ačkoliv autor v práci uvádí, že se jedná o nový hmotnostně spektrometrický přístup, koncept této metody byl publikován před několika lety (Rappsilber J., J. Struct. Bio. 2011 nebo Fischer L. et al., Proteomics. 2013) a využití síťovacích činidel pro studium a kvantifikaci konformačních změn bylo popsáno už v roce 2006 (Huang B.X. et al., Mol. Cell

Proteomics. 2006). Velkým přínosem práce je způsob kvantifikace deuterovaných a nedeuterovaných forem cross-linků, který je založený na simulaci isotopových obálek v programu mMass a následném porovnání s reálnými daty. Dále je velký prostor věnován optimalizaci proteolytického štěpení, která je pro analýzu konformerů naprosto zásadní.

V dalších dvou pracích je chemické síťování a vodík/deuteriová výměna aplikována na studium mechanismu aktivace neutrální trehalasy Nth1 pomocí proteinu Bmh1. Obě metody se vzájemně doplňují s dalšími biofyzikálními metodami typu SAXS nebo měření CD spekter a podávají komplexní pohled na formování proteinového komplexu Nth1-Bmh1.

Z formálního hlediska je disertační práce psána v britské angličtině s minoritním výskytem gramatických chyb, které nestěžují pochopení textu. Problematickým místem formální úpravy jsou citace. Autor poměrně často cituje přehledové články a monografie místo původních pramenů. Formát citací a rovněž seznam literatury není jednotný, některé citace například Boundless 2014, nejsou uvedeny v seznamu literatury.

Navzdory uvedeným nedostatkům na formální úrovni, disertant v práci jasně prokázal, že si velmi dobře osvojil celou škálu moderních experimentálních technik, pomocí kterých získal řadu výsledků, které byly publikovány v kvalitních oborových časopisech. Autor ve své práci potvrzuje schopnost racionálně experimenty analyzovat a střizlivě zhodnotit jejich výsledky. Považuji ji za velmi dobrý, ucelený a věcně sevřený příspěvek, který jednoznačně rozšiřuje současnou úroveň poznání v oblasti studia struktury proteinů.

Na závěr s potěšením konstatuji, že předložená disertační práce Zdeňka Kukačky zcela naplňuje požadavky příslušných zákonných ustanovení a proto ji bez výhrad doporučuji k obhajobě.

Jako podklad pro diskusi bych disertantovi rád položil následující otázky:

1. Autor v práci uvádí, že chemické síťování a nativní hmotnostní spektrometrie ve spojení s měřením iontové mobility jsou metody pro určování trojrozměrné struktury proteinů. Ve většině publikací, ve kterých byl navržen strukturní model proteinu pomocí uvedených technik, je ale velký vliv další metody například modelování, nebo se navrhované modely opírají už o známé struktury proteinů určené pomocí krystalografie, NMR nebo cryoEM. Existuje v současnosti nějaká práce, ve které byla struktura proteinu vyřešena pomocí chemického síťování nebo měření iontové mobility *ab initio*? Je prakticky možné navrhnout strukturní model proteinu jenom na základě chemického síťování, vycházíme-li z teorie distanční geometrie?

2. Autor v práci několikrát zdůrazňuje, že velkou předností chemického síťování je analýza proteinů za fyziologických podmínek. Podmínky, které autor v experimentech používal jako například přítomnost 1.3% DMSO v pufru, však příliš fyziologické nejsou. Dále autor klade velký důraz na fakt, že analýza proteinů probíhá v roztoku a za nízkých koncentrací proteinů. Ve skutečnosti se, ale většina proteinů v buňce a často i mimo buňky nachází v prostředí s vysokou koncentrací okolních proteinů, například cytoplasmatický kalmomodulin se nachází v prostředí, kde je koncentrace proteinů kolem 300-400 g/l. Takto vysoká koncentrace okolních proteinů stabilizuje protein jak entropicky, tak i entalpicky, takzvaným macromolecular crowding efektem, a posouvá rovnováhu ve prospěch stabilnějšího konformeru, ačkoliv se protein v roztoku po zředění může chovat nestrukturovaně. Nejsou tedy zdůrazňované podmínky nízkých koncentrací proteinů, spíše nevýhodou, obzvláště při analýze a kvantifikaci konformačních změn?

3. Změna konformace proteinu může ovlivnit přístupnost nebo reaktivitu některých lysinů, nebo může způsobit změnu orientace postranních řetězců. Reaktivita, orientace a přístupnost lysinů mají zásadní vliv na to, jestli cross-link vznikne nebo nikoliv. Byly uvedené efekty nějakým způsobem zakomponovány do výpočtu při kvantifikaci dvou konformerů kalmodulinu?

4. Jednotlivé konformační stavy proteinů se vzájemně liší nejen strukturně, ale i energeticky, a často je mezi nimi ustavena jemná rovnováha. Chemické síťování je metoda, která v principu může stabilizovat konkrétní konformační stav proteinu. Například flexibilní doména, může být pomocí síťování kovalentně spojena s jinou doménou a následně posouvat rovnováhu v prospěch takto fixovaného konformeru. Experimentálně zjištěný kvantifikační poměr pomocí chemického síťování by v tomto případě byl arteficiálně navýšen ve prospěch fixovaného konformačního stavu. Jakým způsobem se dá ověřit, zdali k takovému efektu během síťování dochází? Je možné takový efekt predikovat nebo ho monitorovat během experimentu?

V Oxfordu, 11. 6. 2015

Daniel Rozbeský