Oponentský posudek disertační práce

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Doktorský studijní program: Biochemie

Uchazeč: Mgr. Zdeněk Kukačka

Pracoviště: Katedra biochemie

Název dizertační práce: Characterization of protein structures using chemical cross-linking and mass spectrometry

Školitel: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Oponent: prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.

Pracoviště oponenta: Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Disertační práce představuje komentovaný souhrn tří článků vzniklých v průběhu doktorského studia Mgr. Zdeňka Kukačky souvisejících s charakterizací struktury proteinů. Autor uvádí dva hlavní cíle práce: (1) vyvinout nový přístup vhodný pro monitorování konformačních změn proteinů s využitím izotopového chemického síťování a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, (2) charakterizovat strukturu proteinu Nth1 v komplexu s Bmh1 s využitím chemického síťování a vodík deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií.

Disertační práce je předložena v anglickém jazyce v klasickém formátu, který obsahuje úvod, výsledky a diskuzi vypracované pro jednotlivé články, souhrn a literární odkazy. Práce má 52 stran, 21 obrázků a 5 tabulek, na které navazují jako příloha originály článků v plném znění.

Úvod disertační práce je v souladu s tématem práce a je zaměřen na charakterizaci struktury proteinů a na metody vhodné pro určení terciární struktury proteinů. Pozornost je také věnována hmotnostní spektrometrii, autor popisuje vybrané ionizační

techniky (ESI, MALDI) a hmotnostní analyzátory (TOF, FT-ICR), zaměřuje se na vysvětlení principu přístupů používaných ve strukturní biologii (nativní hmotnostní spektrometrie, iontová mobilita, vodík deuteriová výměna a chemické síťování). Kapitola sice poskytuje úvodní náhled do problematiky, kterou se zabývá disertační práce, ale zcela chybí část, která by popsala hodnocení dat získaných z hmotnostně spektrometrických analýz a využití těchto výsledků k interpretaci strukturních změn proteinů. V textu se také objevují různé nepřesnosti, např. chyba v literárním odkaze na str. 23., které se však týkají pouze formální stránky.

V další části disertační práce je spojen popis výsledků a jejich diskuze tří vybraných článků. První článek, jehož prvním autorem je Mgr. Zdeněk Kukačka, byl akceptován do časopisu Methods. Popisuje výhody a limitace nového hmotnostně spektrometrického přístupu využívajícího chemické síťování s izotopovým značením kvantitativně mapujícím strukturní změny proteinu kalmodulin s navázaným vápníkem a bez něj. Jsou zde uvedeny výsledky, které student získal, ale nejsou jasně interpretovány závěry celé této studie. Bez nich uvedený komentář k článku vyznívá neúplně a oslabuje kvalitu celé disertační práce. Postup vyhodnocení naměřených dat je zmíněn velice okrajově, chybí objasnění identifikace chemicky zesítěných peptidů pomocí algoritmu Links nebo postup určení poměru lehkého a těžkého činidla pro chemické zesítění modifikovaných peptidů programem mMass.

Dalším analyzovaným proteinem uvedeným v přiloženém článku 2 je Nth1 a jeho interakce s Bmh1, kde jsou pomocí metod chemického zesítění a vodík deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií sledovány konformační změny a interakční místa komplexu Nth1-Bmh1. Autor uvádí velmi pěkné výsledky jasně ukazující strukturní změny mezi volným proteinem Nth1 a komplexem Nth1-Bmh1 v průběhu kinetiky deuterace, které byly také potvrzeny další metodou. Na obrázku 17 (str. 38) jsou tyto změny jasně deklarovány v uvedených grafech vybraných peptidů, avšak v legendě tohoto obrázku je uvedeno, že peptidy formující vazebnou štěrbinu jsou označeny hvězdičkou, a ty jsem na obrázku nenašla.

Poslední studie je zaměřena na roli EF-hand-like motivu v regulaci proteinu Nth1, jenž je popsána v přiloženém článku 3. Byly provedeny bodové mutace v oblasti EF-hand-like motivu rekombinantního proteinu Nth1, u kterých pak byla stanovena stabilita a tvorba komplexu s Bmh1, které se však nelišily od mateřského proteinu Nth1. Dále byl sledován vliv přítomnosti Ca^{2+} na aktivitu pNth1 a/nebo Bmh1 v závislosti na konformačních změnách obou proteinů. K tomuto účelu byly opět použity metody chemického síťování s izotopovým značením a vodík deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií. Získané výsledky z HDX-MS analýz jsou uvedeny na obrázcích 19-21 a z chemického zesítění v tabulkách 4-5, které jasně dokládají, že dochází ke konformačním změnám proteinů. Na obrázku 19 však není uvedena legenda ke grafům, takže orientace ve výsledcích je ztížená.

V souhrnu jsou v bodech krátce uvedeny získané výsledky, které dokládají splnění cílů disertační práce. Chybí však celkové shrnutí, interpretace a přínosy disertační práce, která by si to jistě zasloužila.

Z přiloženého seznamu publikačních výstupů velmi oceňuji množství kvalitních výsledků, které Mgr. Zdeněk Kukačka během svého studia získal. Je za tím vidět velké pracovní úsilí, odhodlané vědecké nasazení, získání nových znalostí i laboratorních zkušeností, které významně přispěly k rozvoji vědecké skupiny RNDr. Petra Nováka, Ph.D., jenž patří k lídrům v oblasti strukturní biologie a hmotnostní spektrometrie v Čechách. Věřím, že to vše bude dále rozvíjet a získá další zajímavé výsledky. Předložená disertační práce však ukazuje, že student mohl věnovat více úsilí některým kapitolám, zaměřit se na interpretaci získaných výsledků a rozvinout přínosy nově zavedené techniky.

Dotazy oponenta k obhajobě disertační práce

1) Proč byly vybrány dvě krystalové struktury kalmodulinu s navázaným vápníkem (1PRW a 3CLN) pro interpretaci získaných dat (viz článek 1)?

2) Budete se dále zabývat optimalizací podmínek štěpení proteinu kalmodulin?

3) Výsledky z HDX analýzy proteinu pNth1 (obrázek 17, str. 38) ukazují kinetiku strukturních změn vybraných peptidů z různých oblastí na povrchu proteinu. Mohl byste uvést, proč u peptidů 110-124 a 121-151 dochází v průběhu času ke snižování změn deuterace mezi pNth1 a Nth1-Bmh1 až na stejnou úroveň na rozdíl od peptidů 102-110 a 156-172, kde rozdíly deuterace trvají po celou dobu?

4) Mohl byste vysvětlit, proč nebyly odhaleny změny v připravených rekombinantních Nth1 proteinech s bodovými mutacemi oblasti EF-hand-like motivu (popis na str. 41), když HDX-MS a chemické síťování jasně ukazují, že tato oblast podléhá konformačním změnám? Z textu disertační práce není jasné, jaké aminokyseliny byly v připravených mutantech vyměněny a proč nebyly analyzovány pomocí HDX-MS (případně proč nejsou tyto experimenty v textu dále rozváděny). Pro oponenta bylo obtížné se v získaných výsledcích zorientovat, a tím získat jasný závěr. Bylo nutné dohledat potřebné informace v přiloženém článku 3.

Závěr

Mgr. Zdeněk Kukačka ve své práci prokázal tvůrčí vědecké schopnosti, je autorem či spoluautorem 6 článků publikovaných v časopisech s IF a jednoho článku přijatého k tisku, získal kvalitní originální výsledky, které prezentoval na zahraničních i tuzemských vědeckých konferencích. I přes výše uvedené připomínky, předložená práce splňuje požadavky standardně kladené na disertační práce v oboru biochemie, proto **doporučuji její postoupení k obhajobě a dalšímu řízení.**

V Brně 12. 6. 2015

prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.