

## Oponentský posudek disertační práce Mgr. Julie Wolfové

### „Insight into the structure of tetrameric flavoprotein WrbA involved in oxidative-stress response“

Úkolem práce bylo vyřešit prostorovou strukturu enzymu WrbA (tryptophan represor binding protein), objasnit do jaké míry ovlivňuje strukturu tohoto proteinu externí prostředí a přinést nové informace o tom, jakou roli tento enzym hraje v buňce. Toto téma dobře zapadá do náplně vědecké laboratoře, kterou vede školitel doktoranda. Práce tak přináší nové poznatky o chování buněk ve stresových situacích.

Obsahem práce Mgr. Julie Wolfové je krystalizace proteinu WrbA a následné stanovení tří struktur potřebných k objasnění funkce tohoto enzymu. Jedná se o strukturu tohoto enzymu bez navázaného kofaktoru, jeho strukturu s navázaným kofaktorem [flavin mononukleotidem (FMN)] a také strukturu WrbA, kde jsou molekuly enzymu v krystalu uspořádány do pravotočivé spirály. Autorka popsala podstatné změny ve struktuře enzymu vyvolané vazbou FMN a našla dále evoluční souvislosti s obdobnými flavo enzymy.

Práce obsahuje 20 stránkový úvod do problematiky a na stranách 21-34 jsou stručně popsány výsledky práce plně diskutované v článcích v odborných časopisech uvedených v příloze (32 stran).

Bylo by lépe, kdyby práce byla napsána jakou souvislý text nezávislý na publikacích v příloze. Po formální stránce je však práce zpracovaná dobře splňuje všechny požadavky kladené na PhD práci.

Je evidentní, že všechny body zadání práce byly splněny. Autorka zvládla obtížné techniky přípravy krystalických proteinů a metodiku proteinové krystalografie. Demonstrovala to úspěšnou přípravou monokrystalů WrbA a vyřešením tří struktur tohoto enzymu. Získané výsledky byly zpracovány a opublikovány v časopisech s velice dobrým renomé a „impact faktorem“ (Biochimica et Biophysica Acta, Acta Crystallographica a Journal of Crystal Growth, Protein Science).

Předložená disertační práce je kvalitní, splňuje předpoklady kladené zákonem a proto ji jednoznačně doporučuji jako podklad k udělení titulu PhD.



V Praze 29. 6. 2012

RNDr. Jindřich Hašek, DrSc

## Oponentský posudek disertační práce

### „Insight into the structure of tetrameric flavoprotein WrbA involved in oxidative-stress response“

**Mgr. Julie Wolfová**

Tématem práce je studium struktury flavoproteinu WrbA. Role rodiny těchto proteinů v živých buňkách je stále ne zcela objasněná.

Autorka se rozhodla předložit práci ve formě pěti komentovaných článků, což je akceptovatelná forma. Z těchto článků jsou čtyři v prestižních mezinárodních časopisech (Journal of Crystal Growth, Acta Crystallographica, Biochimica et Biophysica Acta, Protein Science) s nenulovým impakt faktorem. U třech z nich je Julie Wolfová první autorkou.

Práce je napsána v angličtině logicky a je členěna na standardní části, jazyková i formální úroveň je dobrá. Práce s literaturou, citace a uvádění zdrojů u převzatých obrázků jsou adekvátní.

Úvod práce s komentáři přiložených článků a souhrnem výsledků je na 34 stranách včetně odkazů. Je celý napsán čtivě a výstižně. V úvodu autorka stručně vysvětluje význam studia struktury proteinů a následně se věnuje charakteristice a přehledu známých poznatků o rodině flavoproteinů WrbA, vysvětluje význam studia jejich struktury a vytyčuje hlavní cíle práce – krystalizaci dvou forem proteinu – apoWrbA a holoWrbA, řešení krystalové struktury ze získaných difrakčních dat, detailní komparativní analýzu struktury obou proteinů, strukturní srovnání s flavodoxiny za účelem identifikace rozdílů a jejich vysvětlení vzhledem k funkci a srovnání s funkčními homology (Nqos).

V části dvě se věnuje problematice proteinové rtg krystalografie počínaje krystalizací, kde popisuje proces a vhodné metody dále užití v práci, a stručně i rtg difrakci se zaměřením na řešení struktury (řešení fázového problému) se zaměřením na použitou metodu molekulárního nahrazení.

Dále autorka stručně popisuje zařazené články v souvislosti s celým procesem od krystalizace po 3D analýzu struktury a srovnání s podobnými proteiny. Souhrn hlavních výsledků a jejich diskuse je v části 4.

Podstatnou částí disertační práce byla finálně úspěšná krystalizace tří forem proteinu WrbA, u nichž pak bylo možné určit krystalovou strukturu s rozlišením v rozmezí 1.8-2.6 Å. Struktury byly deponovány do proteinové strukturní databáze PDB. Autorka dále studovala podrobněji strukturní rysy tetramerizace a to studiem typů rozhraní tetrameru a dále rozdílů a změny ve strukturách vyvolané vazbou s kofaktorem FMN (flavin mononukleotid), jehož vliv byl zjištěn na všech úrovních strukturní organizace a našla souvislosti s obdobnými flavoenzymy. Diskutovány jsou nejen vlastní strukturní rysy ale i jejich souvislost s funkcí WrbA. V závěru ještě autorka naznačuje další potřebné směry výzkumu.

Všechny části práce byly popsány a publikovány v recenzovaných časopisech a k práci nemám žádné podstatné připomínky. Dílčí otázky je možné diskutovat při objahobě.

Závěrem je možné konstatovat, že téma disertační práce je aktuální, použité metody jsou aplikovány v moderním výzkumu biomolekulárních strukturních studií. Autorka disertační práce dostatečně prokázala schopnost řešit výzkumný projekt tvůrčím způsobem.

Disertační práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru. Z uvedených důvodů doporučuji práci jako podklad k udělení titulu Ph.D.

V Praze 20. 8. 2012



Doc. RNDr. Radomír Kužel, CSc