

**Oponentský posudek disertační práce Oksany Degtjarik, MSc  
„Crystallization and structure-functional studies  
of bacterial haloalkane dehalogenases and His phosphotransfer  
protein AHP2 from model plant *A.thaliana*“**

Zvolené téma vhodně zapadá do náplně vědecké laboratoře, ve které byl doktorand školen. Práce obsahuje na stranách 1-42 úvod do problematiky. Na stranách 43-90 jsou popsány výsledky práce na různých variantách proteinu LinB (DbeA1, DpcA z psychrotropní bakterie a DmxA z *Marinobacter sp.*). Na stranách 91-140 je krystalová struktura AHP2 a analýza možných interakcí AHP2 s vazebnou doménou jeho přirozeného ligandu CKI1. Na stranách 141-146 jsou shrnuty výsledky práce.

V rámci projektu Oksana Degtjarik, MSc

1. vyřešila pět krystalových struktur vybraných mutantů haloalkane dehalogenas a to konkrétně:
  - optimalizovala krystalizační podmínky mutantů LinB32 (L177W), LinB86 (L44I+H107Q), LinB70 (L177W+W140A+F143L+I211L),
  - stanovila vliv fyzikálně chemických parametrů na krystalizaci,
  - vyřešila dvě krystalové formy holo-LinB32 a komplexu LinB32 s ligandem 1,2 – dibromoethanem,
  - vyřešila strukturu holoenzymu LinB370 a jeho komplexu s 1– bromobutanem,
  - analyzovala vliv změn ve struktuře vyvolaných mutacemi a vazbami ligandů,
  - účastnila se dále na řešení pěti krystalových struktur psychrofilních enzymů DpcA a DmxA a jejich komplexů s ligandy 1-bromohexanem a 1,2-dichloroethanem.
  
2. stanovila strukturu histidine phosphotransfer protein 2 (AHP2) a analyzovala jeho interakce s ligandem (vazebnou doménou histidine kinázy CKI1)
  - našla optimální podmínky krystalizace proteinu AHP2,
  - vyřešila strukturu proteinu AHP2 metodou proteinové krystalografie,
  - analyzovala zjištěné strukturní rozdíly mezi AHP2 a obdobnými proteiny z vyšších rostlin,
  - ověřila způsob vazby AHP2 na CKI1 a zjistila, které interakce jsou významné pro vazebnou specifitu AHP2.

Autorka prokázala v průběhu této práce hluboké znalosti problematiky a schopnost samostatné vědecké práce. Připravila krystaly, vyřešila samostatně několik struktur

proteinů a deponovala je v Proteinové strukturní databance pod kodovým označením 4PAC pro AHP2, 4WDR pro LinB86 a 4WDQ pro LinB32. Podařilo se jí objasnit důvody vazebných změn ve studovaných komplexech. Byl bych rád, aby autorka nastínila další plánované experimenty a uvedla možné využití provedených strukturních studií v praxi.

Autorka publikovala celkem 5 publikací v impaktovaných časopisech. Čtyři práce byly již otištěny v klasickém časopise Mezinárodní krystalografické unie IUCr Acta Crystallographica a jedna práce v J.Cryst.Growth (s vynikajícím impakt faktorem 4.7). Presentovala svoji práci na sedmi mezinárodních vědeckých konferencích. Aktivně se též podílela na přípravě a výuce mezinárodního vzdělávání postgraduálních studentů v rámci Evropského projektu „Schola Ludus“. Je spoluautorkou na jedné patentové přihlášce.

Byly splněny všechny úkoly v zadání disertační práce. Výsledky byly a budou publikovány v řadě uznávaných mezinárodních časopisů. Lze očekávat, že výsledky tohoto základního výzkumu mohou mít uplatnění v dalších biologických oborech a v lékařství. Je zřejmé, že autorka problematice dobře rozumí a zvládla všechny potřebné techniky přípravy krystalických proteinů a metodiku proteinové krystalografie.

Všechny získané výsledky byly zpracovány a deponovány v Proteinové strukturní databázi PDB a v dobře impaktovaných časopisech. Práce je sepsána přehledně. Má všechny předepsané náležitosti a zvolený formát odpovídá požadavkům na disertační práce.

Předložená disertační práce Oksany Degtjarik, MSc splňuje všechny předpoklady kladené zákonem a proto ji jednoznačně doporučuji jako podklad k udělení titulu PhD.

V Praze 15. 10. 2014

RNDr. Jindřich Hašek, DrSc

## Oponentský posudek disertační práce

### „Crystallization and structure-functional studies of bacterial haloalkane dehalogenases and His phosphotransfer protein AHP2 from model plant *A. thaliana*“

**Autorka: Oksana Degtjarik**

Autorka předložila k obhajobě práci sestávající ze tří obecnějších úvodních kapitol a následující části výsledků a diskuse, která je fakticky souborem hlavních publikovaných článků. Na úvod je uveden soupis pěti článků použitých do dizertace, z nichž u tří je Oksana Degtjarik první autorkou. Jedná se o tři publikace v Acta Crystallographica F a jednu v celkem prestižním časopise Crystal Growth and Design. U prvního uvedeného článku mně není zřejmé, jestli je připravován či byl odeslán, případně, do kterého časopisu. V úvodu (prolog) je stručně charakterizován význam práce a hlavní cíle, které jsou rozděleny do dvou projektů – (a) krystalizace a předběžná krystalografická analýza vybraných halogenalkandehalogenas (HLD) a jejich vybraných variant a (b) krystalizace a vyřešení struktury proteinu AHP2 z *Arabidopsis thaliana* a studiu jeho interakce s ligandem.

V obecném úvodu je na 24 stranách rozebrán význam halogenalkandehalogenas a nastíněna jejich možná aplikace při ochraně životního prostředí i pro biodegradaci různých halogenovaných polutantů či jako biosenzorů halogenovaných sloučenin. Z toho také vyplývá, že téma práce je aktuální a význam studovaných látek podstatný i v praxi. Z cca dvou set HLD byla dosud určena struktura pouze u deseti z nich. Autorka charakterizuje jejich strukturní typ, reakční mechanismy a další vlastnosti, zejména selektivitu k substrátu a poté varianty LinB enzymu (LinB32, LinB86 a LinB70), které jsou vybrány pro další studium. Dále se věnuje popisu problematiky signalizace a uvádí přehled dosud vyřešených struktur příbuzných proteinů z fosforylační dráhy AHP2.

Třetí část nazvaná Materiály a metody čítá asi deset stran a je věnována spíše jen metodám, jelikož materiály již byly charakterizovány v části předchozí. Je zde prezentován stručný přehled krystalizačních technik a principy rtg difrakčních metod měření a určení 3D struktury.

Tyto úvodní části pokládám za vcelku výstižně a stručně formulované bez zřejmých faktických chyb. Práce s literaturou se mně jeví adekvátní.

Nejdůležitější částí jsou vlastní výsledky, které jsou prezentovány většinou po jednotlivých člancích s výjimkou části 4.2.2, která je zřejmě připravována k publikaci a také části 4.1.2, u které to není zřejmé. Fakticky se jedná o přepsané články, nikoli však jejich přesné kopie. Odchylky textu od originálních článků jsou ale minimální (např. v citaci 3 z prologu). Naskytá se otázka, proč tedy nebyly použity přímo kopie vyšlých článků resp identické texty. Vzhledem ke zvolené formě práce bych uvítal, kdyby kromě pěkně napsané obecné úvodní společné části shrnující metodiku a dosud známé výsledky byla v práci také obdobná část podobně shrnující a diskutující získané výsledky, ale např. i měření. I když je většina informací uvedena v jednotlivých podkapitolách, byla by širší společná diskuse (tedy v podstatě rozvedení závěrečné části výsledků) pro čtenáře užitečná. Ve zvoleném formátu se navíc některé věci opakují, což vyniká zvláště v autoreferátu, kde jsou do části výsledků v podstatě jen seřazeny jednotlivé abstrakty. Pravděpodobně nelze dvě části, které spolu kromě metodiky příliš nesouvisí

a zřejmě vplynuly ze súčasne řešených projektů, spojit do jednoho textu, ale v rámci každé z částí by to snad možné bylo.

Vzhledem k tomu, že významná část práce byla věnována nalezení vhodných krystalizačních podmínek, v úvodu je přehled krystalizačních metod a byla připravena řada krystalů vhodných pro difrakci, mohlo by být zajímavé uvést souhrnný přehled všech studovaných materiálů vzhledem k tomuto, tedy např. ve formě - materiál, konkrétní úspěšná krystalizační technika, získané velikosti, případně tvar krystalků, rozlišení pro difrakci. U posledního bodu chápu tyto hodnoty uvedené v textech jako omezené výhradně kvalitou krystalů a nikoli měřicími podmínkami jednotlivých experimentů. Je to tak? Jinak nalezení krystalizačních podmínek patří k podstatným výsledkům práce. Zajímavé jsou např. výrazné rozdíly v podmínkách pro krystalizaci variant LinB. Pozitivně lze jistě hodnotit snahu nejen strukturu určit, ale zabývat se i interpretací a funkcí. Jelikož jsou v úvodu zvýrazněny možné praktické aplikace studovaných materiálů, mohlo by být v závěru uvedeno explicitně, jaký pro to mohou mít dopad získané výsledky.

Studentka ve své práci dostatečně projevila schopnost řešit výzkumný projekt tvůrčím způsobem a zúročit své bohaté zkušenosti zejména s krystalizací proteinů. Práce je psána anglicky. Jazyk je akceptovatelný bez patrných chyb, alespoň, jak mohu posoudit. Studentku znám z účasti na několika akcích i jako velmi schopnou organizátorku laboratorních kursů a ani v nejmenším nepochybují, že splňuje kritéria pro udělení titulu Ph.D.

Disertační práci také doporučuji jako podklad k udělení tohoto titulu po úspěšné obhajobě.

V Praze 18. 11. 2014



Doc. RNDr. Radomír Kužel, CSc.

## Posudek na doktorskou disertační práci Oksany Degtjarik

### **Crystallization and structure-functional studies of bacterial haloalkane dehalogenases and His phosphotransfer protein AHP2 from model plant *A. thaliana***

Doktorská disertační práce Oksany Degtjarik, MSc. shrnuje výsledky studií zabývajících se studiem optimálních podmínek krystalizace dvou nesouvisejících tříd proteinů, dehalogenáz a proteinu AHP2 fosforylační kaskády. Cíle práce jsou shrnuté v úvodu na straně 4. Strukturně biologicky zaměřená studie se soustředí na kritický krok krystalografické analýzy, krystalizaci vzorků, věnuje se rovněž stanovení a analýze studovaných proteinů.

V první části práce jsou diskutovány optimální krystalizační podmínky nově navržených variant dehalogenáz. Výsledky studia krystalizace variant dehalogenáz LinB, DpcA, DmxA a DbeA1 jsou shrnuty ve dvou publikacích v *Acta Crystallographica F* a jedné v *Crystal Growth & Design*. Práce popisují krystalizační podmínky a analyzují předběžná difrakční data. Souhrn popisující strukturní a enzymatické vlastnosti této široké třídy enzymů ukazují na porozumění problematice, autorka těží i z rozsáhlé zkušenosti laboratoře se studiem této třídy enzymů. Návrhy konkrétních variant jsou stručně zmiňovány v úvodu, není ale zřejmé, zda byly prováděny za spoluúčasti autorky. Ostatní metody, které zjevně musely být rovněž použité v rámci autorčinných projektů, na mysl mám například techniky molekulární biologie nutné k expresi proteinů a analytické postupy purifikace proteinů, nejsou v práci nijak diskutovány.

Druhá část práce se věnuje studiu krystalizace proteinu z fosforylační dráhy AHP2. Úvod do složité problematiky signalizace poskytuje přehled vyřešených struktur proteinů příbuzných AHP2 a shrnuje základní funkce AHP2. Výsledky krystalizace jsou shrnuty v publikaci v *Acta Crystallographica F*. Cenné je, že krystalovou strukturu AHP2 se podařilo vyřešit fázováním technikou SIRAS na rozlišení 2.5 Å, práce je v rukopise. Porovnání struktury AHP2 s ostatními známými strukturami fosfátových přenašečů ukazuje velkou podobnost, všechny struktury vykazují pentahelikální fold ne nepodobný foldu interleukinů z rodiny IL-10. Rukopis rovněž diskutuje molekulárně dynamickou studii interakce AHP2 s částí histidinové kinázy. Předpovězené kontakty byly částečně experimentálně ověřeny NMR spektroskopii komplexu v roztoku.

V celé práci jsou literární zdroje jsou citovány pečlivě, rovněž z nich vyplývá, že práce je součástí dlouhodobějšího úsilí laboratoří na Jihočeské univerzitě a zejména na Masarykově univerzitě komplexně studovat enzymologii dehalogenáz, nově i strukturní biologii fosforylační kaskády v rostlinách. Metody a materiály použité v práci jsou popsány dostatečně podrobně, zejména v citovaných publikacích. Ani pro jeden ze studovaných proteinů jsem v disertační práci nenalezl odstavec nebo tabulku racionalizující nebo alespoň shrnující dosažené optimální krystalizační podmínky. Je možné dosažené výsledky zobecnit?

Přes určitou zkratkovitost a účelové spojení dvou vnitřně nesouvisejících témat předkladatelka zcela prokazatelně zvládla moderní experimentální metody molekulární biologie a zejména biofyzikálních aspektů krystalizačního procesu a je třeba ocenit systematické úsilí autorky i laboratoře ujmát se nevděčné úlohy krystalizovat proteiny.

Na základě této práce doporučuji žádost Oksany Degtjarik, MSc. o udělení titulu Ph.D. ke kladnému vyřízení a doporučuji přijmout práci k obhajobě.

V Praze 18. listopadu 2014

Bohdan Schneider