

doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D.
České vysoké učení technické v Praze
Břehová 7
115 19 – Praha 1

Posudek disertační práce

Disertační práce *Mgr. Barbory Kašćákové* s názvem „**Structural insight into the salivary serpins of *Ixodes ricinus***“ se zabývá biofyzikální, strukturní a výpočetní analýzou čtyř doposud neprobádaných proteinů (serpinů) klíštěte *Ixodes ricinus*. Z vědeckého i praktického hlediska se jedná o téma závažné a stále aktuální. Disertační práce si proto zaslouží pozornost širšího vědeckého kolektivu.

Práce obsahuje celkem 163 stran textu, obrazové dokumentace a tabulek. Její členění je mírně nestandardní, ale jen podtrhuje originalitu práce.

Prvních 15 stran je věnováno úvodu do problematiky studovaných makromolekul včetně motivace celého výzkumu a fyziologie klíšťat. Tato oblast je napsána velmi poutavě, přehledně a je doplněna detailním obrazovým materiálem. Podává ucelený úvod do třídy serpinů, jejich interakcí a roli v různých organismech.

Následujících 12 stran představuje úvod do metodik se zaměřením na rentgenovou krystalografii. Tato oblast obsahuje některé nedokonalosti, které budou zmíněny později. Nicméně ve zkrácené formě udává čtenáři jasný přehled o užitých metodikách, které autorka využívala a které se vyskytují v následujícím textu.

Nejobsáhlejší částí jsou výsledky a diskuze v rozsahu 127 stran. Tato kapitola je dále členěna na čtyři podkapitoly, které se jednotlivě věnují proteinům Irpin-3, Irpin-5, Irpin-4 a Irpin-1. Jednotlivé podkapitoly jsou dále členěny tak, že připomínají strukturu jednotlivých článků, o které se práce opírá. Jedná se tak o velmi přehledný text, ale mou první výtkou k předložené práci je nekonzistence a různé formátování části textů a tabulek u odpovídajících si oblastí. Například tabulky s charakteristikami kvality difrakčních dat a jejich zpracování (strany 75 a 149). Domnívám se, že autorka měla práci lépe sjednotit.

S výjimkou odkazů na užitou literaturu je poslední kapitolou Shrnutí, které pokrývá celý vědecký obsah předložené práce. Celková koncepce obsahuje nebývale široké spektrum metodických přístupů či výpočtů a vskutku velmi široký rozsah odvedené práce, kterou autorka s logickou výstavbou a návazností správně diskutuje, což jenom dále podtrhuje vysokou kvalitu předložené práce.

V práci jsem objevil následující nedostatky, nebo přidávám komentář:

- Strana 3, třetí odstavec, druhá věta - ... “because they inhibit“ ?
- Strana 16, začátek kapitoly 2.1.1 – autorka opomenula izolaci ze zdrojového organismu.
- Strana 20: These two solutions diffuse INTO each other.
- Autorka neuvádí přelomový nástroj pro řešení nových struktur – AlphaFold2.
- Strana 26, první slovo: překlep „models“
- Strana 26: jiné formátování odstavce týkajícího se okupancí, než ostatního textu.

- g) Strana 27: The Protein Data Bank rovněž poskytuje k novým strukturám zpracované strukturní faktory i mapy elektronové hustoty, čili se nejedná pouze o databázi výsledných modelů.
- h) Strana 44: Nevhodná sazba obrázku a jeho legendy (opakuje se u mnoha následujících obrázků).
- i) Strana 67: Nedokonalosti (např. chybějící mezery) v citované literatuře, například č.70 a 72.
- j) Nekonzistence značení PDB kódů (střídající se velká a malá písmena).
- k) Strana 91: V literatuře se obvykle uvádí spíše informace o jaké proteázy jde, než pouhý výčet PDB kódů.
- l) Strana 131: Pozor, BL14.2 BessyII je vybavena detektorem PILATUS 3M.
- m) Strana 149: Zřejmě záměna údajů u hodnoty R_{meas}.

K práci mám následující otázky:

- 1) Z textu nevyplývá, jestli byl gen syntetizován, nebo například získán metodou PCR z přírodního zdroje. Prosím o dovysvětlení.
- 2) Strana 22 - Storage ring of X-ray beams? Prosím o tři čtyři věty vysvětlení podstaty synchrotronu. Co se nachází v akumulacním prstenci a jakým principem jsou rentgenové paprsky získávány?
- 3) Na základě jakých kritérií byl stanoven difrakční limit (rozlišení) pro jednotlivé krystalové struktury?
- 4) Štěpení Irpin-3 a Irpin-5 pozorované v krystalových strukturách by mělo být patrné i pomocí analýzy SGS-PAGE. Dle předloženého materiálu toto nebylo pozorováno ani po refoldingu. Je tedy možné, že ke štěpení dochází až v průběhu krystalizace? Byly pomocí SGS-PAGE analyzovány některé z vytvořených krystalů?
- 5) Jaká je vzdálenost Calfa atomů reziduí 355 a 363 u struktury proteinu Irpin-3? Je možné, že se protein nachází v latentní konformaci a chybějící rezidua pouze nejsou vidět v mapách elektronové hustoty?

Závěrem konstatuji, že práce je velmi kvalitní, obsahuje ohromnou spoustu nových, zajímavých a doufejme i aplikovatelných výsledků. Velice vyzdvihuji metodický rozsah. Práce je podpořena dvěma publikacemi již přijatými, jednou publikací v redakčním řízení a jedním rukopisem ve finálním stádiu před odesláním. Text disertační práce sice obsahuje velké množství nedostatků, ale jedná se o nedostatky bezvýznamné, formální. Pokud budou mé dotazy správně zodpovězeny, navrhuji hodnocení „1 – výborně“ s výstrahou! Práci doporučuji jako podklad pro udělení doktorského titulu – Ph.D.

V Praze, dne 17.5.2022