

## **Oponentský posudek**

### **na doktorskou disertační práci Mgr. Lucie Motlové nazvanou: „Konformace adenylátcyklázového toxinu *Bordetella pertussis*“**

Hlavním cílem předložené doktorské disertační práce byla strukturní charakterizace RTX (Repeats in toxin) domén RTX toxinů různých bakterií, porovnání získaných struktur s již vyřešenými RTX strukturami a vytvoření modelu celé RTX domény CyaA. RTX toxiny jsou virulentní faktory syntetizované různými skupinami Gram-negativních patogenů a díky tomu patří mezi intenzivně studované proteiny. Disertační práce Mgr. Lucie Motlové se zaměřuje na RTX domény čtyř zástupců skupin leukotoxinů a hemolyzinů, jejichž producenti jsou *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, tedy významné savčí či lidské patogeny. Z těchto důvodů je detailní strukturní analýza těchto toxinů žádoucí a aktuální téma.

Disertační práce Mgr. Lucie Motlové je psána česky standardním způsobem a je členěna na přehled literatury, materiál a metody, výsledky, diskusi, souhrn a přehled použité literatury. V přehledu literatury autorka shrnuje základní fakta o RTX proteinech, známých strukturách RTX toxinů a více pozornosti pak věnuje několika vybraným RTX toxinům. Metodická část obsahuje poměrně detailní popis použitých metod včetně rentgenostrukturní analýzy. Kapitola prezentující výsledky práce je členěna do dvou částí, v první se autorka věnuje přípravě, krystalizaci a rentgenostrukturní analýze RTX domén vybraných toxinů, v druhé pak vytvoření modelu RTX domény CyaA a jeho srovnání s naměřenými SAXS daty. Autorce a jejím kolegům se podařilo vyřešit tři krystalové struktury s vysokým rozlišením: RTX LtxA, RTX CyaA blok 5 a RTX CyaA bloky 4 a 5. S pomocí těchto struktur byly následně připraveny dva modely celé RTX domény proteinu CyaA, přičemž první model využil *ab initio* obálku vypočítanou z dostupných SAXS dat této domény.

Předložená disertační práce jasně ukazuje, že výsledky Mgr. Lucie Motlové výrazně přispěly k detailní strukturní charakterizaci RTX domény RTX toxinů. V rámci svého disertačního projektu získala Mgr. Lucie Motlová bezesporu bohaté zkušenosti s přípravou rekombinantních proteinů, jejich krystalizací a řešením jejich struktury pomocí difrakce rentgenového záření.

Z hlediska formální podoby je práce psána přehledně, nicméně se v ní (zejména v kapitolách Materiál a metody a Výsledky) vyskytuje dost překlepů, žargonu, formulačních nepřesností či neobratností. Uvedu zde jen dva příklady. Autorka v práci často používá termín „gelová filtrace“, toto je však hantýrka a korektní název této metody je „gelová permeační chromatografie“. Dále autorka používá s oblibou termín „lovení krystalů“, vhodnější by však bylo „přenesení či vyjmutí krystalů“. Také bych přivítal o něco obsáhlejší diskusi, kde by mohla autorka lépe vysvětlit, v čem nové struktury přispěly k pochopení funkce RTX toxinů. Nicméně tyto drobné formální nedostatky celkovou kvalitu práce nijak nesnižují. Výsledky práce byly publikovány ve velmi kvalitních mezinárodních časopisech s IF včetně jedné v prestižním časopise Molecular Cell. Na jedné z těchto publikací je Mgr. Lucie Motlová první autorkou.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám následující dotazy, které jsou spíše náměty pro diskusi:

1. V kapitole 2.1.4 na straně 22 uvádíte „... balení RTX domén do nativní konformace je do značné míry proces poháněný snížením entropie C-konce“. Mohla by autorka toto tvrzení více vysvětlit? Snížení entropie C-konce RTX domény (tedy záporná hodnota  $\Delta S$ ) bude nepříznivě přispívat k hodnotě  $\Delta G$  procesu sbalení domény, takže těžko může být faktorem „pohánějícím“ proces sbalování RTX domén.
2. Mohla by autorka vysvětlit fyzikálně-chemický princip krystalizace proteinů metodou difúze par?
3. Proč byl pro molekulové nahrazení při řešení fázového problému použit zrovna program Phaser?
4. V kapitole 3.3.4.2 na straně 43 tvrdíte, že během rafinování struktur jste se snažila získat model s nejvyšší možnou hodnotou R-faktoru,  $R_{\text{free}}$ -faktoru a RMSD od ideálních délek vazeb, úhlů a planarity. Jste si jistá, že vaším cílem byla opravdu maximalizace těchto parametrů?
5. V kapitole 3.2.1.9 na str. 38 uvádíte, že během gelové permeační chromatografie byla sledována absorbance při 220 nm, tedy ne při obvyklých 280 nm. Byl k tomu nějaký důvod?
6. V kapitole 4.1.3.3 uvádíte, že jste měla problém s řešením fázového problému u TRX LtxA, který se později podařilo vyřešit doc. P. Kolenkovi. Můžete specifikovat v čem se lišil váš přístup od přístupu doc. Kolenka?
7. Na obr. 22 prezentujete shodu SAXS obálky RTX bloku 4-5 s krystalografickou strukturou 6SUS.pdb. Byla ověřována i shoda teoretické rozptylové křivky (vypočítané z krystalové struktury) s experimentálními rozptylovými daty?
8. Proč byl připraven druhý model RTX domény CyaA (obr. 24B na str. 62)? První model (obr. 24A) je validován prostřednictvím SAXS dat a pravděpodobně lépe reprezentuje strukturu této domény v roztoku.
9. Jak si vysvětlujete skutečnost, že velikost sekretovaného proteinu koreluje s počtem RTX repetitivních jednotek pro jeho translokaci?

### **Závěrem konstatuji:**

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Lucie Motlové představuje cenný přínos k strukturní charakterizaci RTX toxinů. Práce je psána srozumitelně, všechny výsledky práce

byly publikovány. Autorka ve své doktorské disertační práci dokázala, že je vyspělou vědeckou pracovnící, schopnou samostatné výzkumné práce.

Jelikož předložená práce Mgr. Lucie Motlové vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně **doporučuji** její přijetí k obhajobě.

V Praze 25. listopadu 2021

prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.  
Katedra fyz. a makromol. chemie  
Přírodovědecká fakulta UK, Praha