

Posudek na disertační práci Mgr. Lucie Motlové „Konformace adenylátcyklázového toxinu *Bordetella pertussis*.“

Doktorandka se v předložené práci věnuje struktuře RTX domén vybraných RTX proteinů a roli, jakou má balení RTX domény do nativní konformace při sekreci těchto proteinů. Z důvodu očekávané strukturní analogie v C-terminální oblasti proteinů („The C-Terminal RTX Folding-Nucleating Capping Structure Scaffold“) byly pro krystalizaci příslušných RTX domén vybrány 4 RTX toxiny různých bakterií. Struktury RTX domén proteinů ApxI a Hly se získat nepodařilo. Podařilo se získat krystaly a vyřešit strukturu RTX domény proteinu LtxA a strukturu RTX domén proteinu CyaA, a to konkrétně RTX bloku 5 a RTX bloků 4 a 5. Struktury RTX CyaA bloků jsou prezentovány jako součást dvou publikací doktorandky, přičemž u jedné z těchto publikací je doktorandka první autorkou. Ostatní předložené publikace (6 publikací) se z hlediska tématu týkají jiné oblasti, řeší se v nich struktura komplexů inhibitorů nebo aptameru s proteiny důležitými pro rozvoj vážných onemocnění. Doktorandka se na těchto publikacích podílela krystalizací příslušných komplexů nebo při řešení jejich struktur. Doktorandka tak prokázala schopnost vědecké práce v této nelehké oblasti biologického výzkumu, kde nelze vždy zaručit úspěšné splnění vytýčených cílů, což závisí na nalezení optimálního protokolu pro purifikaci a krystalizaci konkrétního proteinu.

V první části disertační práce je proveden Přehled literatury poskytující přiměřený úvod do studované problematiky. Ke srozumitelnosti by přispěla ještě jedna závěrečná editorská kontrola textu, viz poslední odstavec kapitoly 2.1.3, str. 19 nebo nechtěné vložení popisku obr. 6 do textu v kapitole 2.2.2, str. 24. V kapitole 2.1.3 věnované sekreci RTX toxinů bych uvítal zmínku o energetice transportního procesu, viz otázky v závěru posudku. Dále práce obsahuje bohatý přehled metod nezbytných pro krystalizaci a řešení struktur proteinových konstruktů. Tento přehled dokumentuje laboratorní a bioinformatickou náročnost krystalografie proteinů. Ve Výsledcích doktorandka prezentuje výsledky purifikace a krystalizace proteinových struktur. V případech, kde byl krystalizační proces úspěšný, provádí popis obdržených struktur. Klíčovým výsledkem předkládané práce, který má význam pro studium funkce a sekrece studovaného CyaA toxinu, je vytvoření dvou atomárních modelů celé RTX CyaA domény na základě krystalografických struktur RTX CyaA domén a s využitím dat získaných pomocí malouhlového RTG rozptylu (metoda SAXS). V Diskuzi doktorandka srovnává obdržené struktury s publikovanými strukturami jiných RTX proteinů. V tomto oddíle bych očekával i podrobnější diskuzi výsledků prezentovaných v publikaci, jejíž je doktorandka první autorkou, viz otázky. Na závěr této části posudku bych shrnul, že doktorandka doložila schopnost vědecké práce,

dostatečnou publikační aktivitu a zároveň i výsledky, které mají originální význam pro studovanou problematiku.

Otázky k obhajobě:

1. Jak je sekrece RTX toxinů závislá na spotřebě ATP nebo na protonovém elektrochemickém gradientu? Je tedy balení RTX domén do nativní konformace jednou ze sil, které ženu a řídí transport RTX toxinu pomocí bakteriálního T1SS systému?
2. V obrázku 16 jsou srovnány dvě metody separace odštěpeného GST tagu. V popisku je uvedeno, že očekávaná velikost proteinu na SDS-PAGE byla cca 37 kDa, což však neodpovídá pozici srovnávaných a vyznačených proužků. Této délce by odpovídal proužek nacházející se v Ilb dráze výše, jak si to vysvětlit?
3. Pochopil jsem správně, že i RTX CyaA bloky 4 a 5 byly purifikovány za použití Ilb metody pro separaci GST tagu? Mohl by tento způsob separace pomoci i v případě konstruktů, u nichž krystalizace nebyla úspěšná, tj. nevedla k získání dat z difrakce?
4. V obou předložených publikacích, které se věnují studiu sekrece CyaA toxinu, se pracuje s hypotézou, že RTX toxiny se translokují přes T1SS transportní systém pomocí takzvaného „push-ratchet“ mechanismu (mechanismus rohatky se západkou). Co konkrétně oba modely předložené pro RTX doménu CyaA toxinu znamenají pro ověření navrhovaného mechanismu?
5. V práci se řeší nativní struktura RTX domén v přítomnosti mM koncentrací Ca^{2+} iontů. Jak by dopadla krystalizace proteinových konstruktů v nižších koncentracích Ca^{2+} odpovídajících cytosolu? Jak je koncentrace Ca^{2+} důležitá pro jednotlivé kroky purifikace?
6. V práci se prezentuje i úspěšná krystalizace RTX toxinu LtxA. Získaný krystalografický výsledek se však v práci příliš nediskutuje. Potvrzuje tedy tento výsledek plně předpokládanou strukturu ve srovnání s C-koncovými oblastmi dalších RTX proteinů obsahujících „folding core“?

Na závěr konstatuji, že předloženou práci, po zodpovězení otázek a připomínek obsažených v tomto posudku, doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 29. 11. 2021

RNDr. Aleš Holoubek, Ph.D.

Odd. proteomiky

Ústav hematologie a krevní transfuze