

## Oponentský posudek diplomové práce

### Aleš Kravice: Využití rentgenové difrakční analýzy při studiu oxidačních stavů flavin-dependentních oxidáz

Tématem předložené diplomové práce Aleše Kravice bylo studium FAD-dependentní oxidoreduktázy z termofilní vláknité houby *Chaetomium thermophilum*. Studie byla zaměřena na strukturně biologickou analýzu aktivního centra enzymu za různých redoxních podmínek. Zvláštní pozornost byla věnována změně konformačních stavů nekovalentně vázaného flavinového kofaktoru. Metodické jádro práce představovala rentgenová difrakční analýza krystalů studovaného enzymu.

Práce je sepsána v českém jazyce, má 51 stran a obsahuje 11 obrázků, 4 tabulky a jednu přílohu. V seznamu citované literatury najdeme 45 referencí. Celý text je dělen na teoretickou a experimentální část. V teoretické části se autor věnuje obecnému výkladu makromolekulární krystalografie, popisu experimentálního uspořádání a metod a bližšímu seznámení s enzymy využívajícími kofaktor FAD. Dále jsou jasně vytčeny cíle práce a následuje experimentální část. Ta je zakončena shrnutím získaných výsledků do několika bodů.

Téma předložené práce je vysoce zajímavé, protože detailní popis struktury aktivních míst enzymu je zcela klíčový pro pochopení reakčního mechanismu. Stejně tak se jedná o nezbytnou informaci v případech, kdy chceme v rámci biotechnologií substrátovou specifitu daného enzymu pozměnit. Přestože je struktura relativně malých organických molekul kofaktorů již dávno popsána, v prostředí celého enzymu, kdy je ovlivňována řadou sousedních aminokyselin, případně i složitějšími pohyby uvnitř proteinové struktury, může nabývat netypických forem.

Nejdůležitějším výsledkem práce je bezpochyby charakterizace pěti nových krystalových struktur tohoto proteinu, získaných za různých, chemicky či fyzikálně modifikovaných podmínek. V diskusi je věnována pozornost především míře ohnutí isoalloxazinového kruhu kofaktoru, která se mírně liší, ale nikde nedosahuje takové planarity, která bývá typicky popisována pro oxidovanou formu.

K práci mám několik komentářů:

- 1) Vzhledem k tomu, že jádrem vlastní práce je zkoumání geometrie molekuly kofaktoru, bylo by možné vhodné, kdyby jeden z obrázků znázorňoval onu proměnu planární molekuly na ohnutou, ke které typicky dochází při redukci.
- 2) Zkoumaný protein se v práci objevuje náhle, v okamžiku své deglykosylace (str. 32). Není uveden jeho zdroj, expresní systém, ani popis purifikace, či poznámka, že jsou tyto detaily popsány v jiném článku. Součástí podobných prací bývá i aminokyselinová sekvence zkoumaného proteinu.
- 3) Na str. 33 a 34 je popsán postup krystalizace proteinu. Bylo by asi vhodné doplnit i objemový poměr proteinu a precipitantu v kapce a pro přesnou reprodukovatelnost i přesný objem kapky. Fotografie získaných krystalů, které jsou zde přiloženy se asi více hodí do oddílu „Výsledky a diskuse“.

K práci mám tyto dotazy:

1. Existují nějaké inhibitory tohoto enzymu, které by měly schopnost zablokovat ho v jeho oxidované formě?
2. Domníváte se že „in“ a „out“ pozice serinu 607 může souviset s redoxním stavem kofaktoru, nebo jsou to zcela nezávislé parametry?

Závěrem bych chtěl dodat, že zcela splňuje stanovené zadání, považuji ji za vysoce kvalitní a navrhuji ji hodnotit stupněm A.

V Praze 7. 9. 2021

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.