KATEDRA FYZIKÁLNÍ A MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE PŘF UK V PRAZE

prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Tel. +420-221-951-303
E-mail: obsil@natur.cuni.cz

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci Ing. Leony Švecové nazvanou: „X-ray structural analysis of flavin- and Cu-dependent oxidoreductases for biotechnological and medical purposes“

Hlavním cílem předložené doktorské disertační práce byla strukturní charakterizace FAD-dependentní oxidoredutasy z houby *Chaetomium thermophilum* (*Ct*FDO) a biliruboxidasy z rostlinného patogenu *Myrothecium verrucaria* (*Mv*BOx). V obou případech se jedná o enzymy zajímavé z hlediska biotechnologického využití, *Ct*FDO v procesu degradace lignocelulosy, *Mv*BOx má zase aplikační využití v hybridních palivových článcích, biosensorech či při odstraňování syntetických barviv. Z těchto důvodů je detailní strukturní analýza těchto enzymů žádoucí a aktuální téma.

Disertační práce Ing. Leony Švecové je psána anglicky klasickým způsobem a je členěna na literární úvod, cíle práce, přehled použitých metod, přehled hlavních výsledků práce, diskusi, závěr a přehled použité literatury. V rámci literárního přehledu autorka nejdříve popisuje principy metod biofyzikální charakterizace proteinů s důrazem na rentgenostrukturní analýzu, což je následováno informacemi o studovaných enzymech. Kapitola prezentující výsledky práce je členěna do dvou bloků, první představuje výsledky týkající se *Ct*FDO, druhý *Mv*BOx. V případě *Ct*FDO autorka pracovala jak s plně glykosylovanou, tak i deglykosylovanou formu enzymu, provedla screening knihovny možných substrátů *Ct*FDO a vyřešila krystalové struktury deglykosylované formy enzymu s navázaným kofaktorem FAD a dále sedmi komplexů *Ct*FDO s různými fragmenty. Tyto výsledky ukázaly, že *Ct*FDO má široce otevřené aktivní centrum obsahující unikátní His-Ser pár. Struktury komplexů naznačily polohu několika vazebných míst pro substrát(y), které přednostně váží aromatické uhlovodíky. To spolu s konformační flexibilitou naznačuje, že substrát tohoto enzymu bude mít komplexní polyaromatický charakter. V rámci screeningu možných substrátů se však nepodařilo identifikovat vhodný substrát tohoto enzymu.

V rámci druhého bloku výsledků autorka prezentuje krystalové struktury enzymu *Mv*BOx, které ukázaly přítomnost kovalentního cross-linku mezi W396 a H398 v aktivním centru, který hraje klíčovou úlohu při oxidaci bilirubinu a substituovaných fenolů. Struktury *Mv*BOx s navázaným iontem ferrikyanidu umožnily identifikaci vazebného místa pro substrát.

Předložená disertační práce jasně ukazuje, že výsledky Ing. Leony Švecové výrazně přispěly k detailní strukturní a funkční charakterizaci obou studovaných oxidoreduktas. V rámci svého disertačního projektu získala Ing. Leona Švecová bezesporu bohaté zkušenosti

s krystalizací proteinů a řešením jejich struktury pomocí difrakce rentgenového záření. Kromě rentgenostrukturní analýzy se seznámila i s řadou metod biofyzikální charakterizace proteinů.

K formální podobě práce nemám žádné závažné připomínky, práce je psána přehledně s nízkým výskytem překlepů či formulačních nepřesností. Rád bych vyzdvihl vysokou kvalitu strukturních obrázků. Výsledky práce byly publikovány v mezinárodních časopisech s IF. Na jedné z těchto publikací je Ing. Leona Švecová první autorkou.

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

1. V práci uvádíte, že glykosylace rekombinantně připravené *Ct*FDO by mohla být důvodem absence enzymové aktivity. Proč tedy byl screening možných substrátů proveden s plně glykosylovaným enzymem a deglykosylovaný byl použit jen pro několik vybraných substrátů?
2. Je nějaký rozdíl v glykosylaci *Ct*FDO izolované z původního organismu *Chaetomium thermophilum* a rekombinantně připravené v *Aspergillus oryzae*?
3. Je možné, že by katalytická funkce *Ct*FDO vyžadovala kromě FAD přítomnost ještě nějakého dalšího kofaktoru?
4. V kapitole 6.3 uvádíte, že použitá metoda stanovení aktivity *Ct*FDO pomocí ROS-Glo H_2O_2 není optimální vzhledem k možnosti vazby benzothiazolové skupiny enzymem. Proč tedy byla použita právě tato metoda ke sledování enzymové aktivity *Ct*FDO?
5. Závislost reakční rychlosti *Mv*BOx na koncentraci substrátu byla sigmoidální pouze v případě bilirubinu. Existuje pro tento odklon od kinetiky Michaelise-Mentenové (a přítomnost allosterie) nějaké mechanistické vysvětlení? Souvisí to nějak s cross-linkem mezi W396 a H398 v aktivním centru?

Závěrem konstatuji:

Předložená doktorská disertační práce Ing. Leony Švecové představuje cenný přínos k strukturní a funkční charakterizaci oxidoreduktas. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, všechny výsledky práce byly publikovány. Autorka ve své doktorské disertační práci dokázala, že je vyspělou vědeckou pracovnicí, schopnou samostatné výzkumné práce.

Jelikož předložená práce Ing. Leony Švecové vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně **doporučuji** její přijetí k obhajobě.

V Praze 21. září 2021

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