

Vyjádření vedoucího diplomové práce

Hodnocení diplomové práce Bc. Aleše Kravice „Využití rentgenové difrakční analýzy při studiu oxidačních stavů flavin- dependentních oxidáz“

Diplomová práce A. Kravice je zaměřena na otázku strukturního stavu oxidovaného, redukováného nebo částečně redukováného flavinu u nové oxidázy z bakterie *Chaetomium thermophilum*. Studovaný enzym vykazuje zvláštní chování kofaktoru flavinu, kdy, alespoň v doposud pozorovaných strukturních výsledcích, byl pozorován značný ohyb isoaloxazinu, napovídající vždy spíše přítomnost redukováného než oxidovaného stavu tohoto kofaktoru. Tato práce se věnuje experimentům, především z oblasti monokrystalové rentgenové difrakce, které mají vést k objasnění výskytu oxidovaného a redukováného stavu flavinu a jejich strukturní podoby.

Předmět této práce je součástí výzkumného programu Laboratoře struktury a funkce biomolekul Biotechnologického ústavu AV ČR v oblasti nových enzymů. Navazuje na výsledky doktorského studia Ing. Leony Švecové a je snahou o zodpovězení otázek, které vyvstaly v průběhu předchozího projektu.

Autor předkládá práci obsahující základní teoretické předpoklady k uvedeným experimentům, cíle diplomové práce, popis použitých experimentálních postupů, popis jednotlivých výsledků včetně jejich interpretace a závěrečné shrnutí.

Autor úspěšně realizoval přípravu vzorku deglykosylací, experimenty denaturující elektroforézy, spektrofotometrické detekce oxidovaného a redukováného stavu enzymu, krystalizační experimenty včetně nalezení a otestování nové krystalizační podmínky tohoto enzymu, přípravu krystalů pro difrakční měření, difrakční měření, zpracování difrakčních dat, řešení struktur, upřesňování modelů struktur enzymu a analýzu změn v oblasti aktivního místa enzymu.

Autor provedl sérii měření rentgenové difrakce na synchrotronovém zdroji záření na několika různých typech krystalů s parametry měření nastavenými tak, aby bylo možné získat informace o stavech enzymu a kofaktoru co nejbližší výchozímu (oxidovanému) stavu a současně za stavu maximální chemické redukce. I přes obtížnost zpracování difrakčních dat se podařilo autorovi získat tři sady dat se sníženou expoziční dávkou. Struktury byly upřesněny do stavu potřebného pro srovnání struktur z hlediska souřadnic flavinu a nejbližšího okolí v aktivním místě enzymu.

Analýza struktur vůči referenční struktuře a předchozím publikovaným výsledkům vedla k důležitým závěrům o stavech flavinu v aktivním místě této oxidázy. Největším přínosem jsou strukturní údaje o chemicky redukováném enzymu, které společně s dalšími výsledky naznačují, že vlastní struktura enzymu již pravděpodobně podporuje významný ohyb isoaloxazinu a/nebo se oxidovaný a redukováný stav flavinu v tomto aktivním místě významně geometricky neliší.

Autor prokázal teoretické znalosti a praktické dovednosti v oboru proteinové krystalografie, zvládnutí dodatečných experimentálních metod nezbytných pro provedení analýzy, schopnosti práce s literaturou, formulace výzkumných výsledků a vyvození závěrů. Výsledky této práce jsou přínosem při řešení otázek v projektu laboratoře vedoucího diplomové práce.

Závěr:

Diplomová práce Bc. Aleše Kravice splňuje požadavky kladené na diplomovou práci, a proto doporučuji její přijetí jako podkladu pro udělení titulu Ing. v oboru Fyzikální inženýrství při Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské ČVUT v Praze. Navrhuji hodnocení této diplomové práce stupněm B.

Ve Vestci, 7. 9. 2021

Ing. Jan Dohnalík, Ph.D.
vedoucí diplomové práce

