

RNDr. Olívia Petrvalská, Ph.D.
Průmyslová 595
252 50 Vestec

Oponentský posudek bakalářské práce

Jakub Hrubý: Difrakční studie modifikace kovového klastru S1 nukleasy

Předkládaná bakalářská práce Jakuba Hrubého se zabývá studiem strukturních změn S1 nukleasy z *Aspergillus oryzae* způsobených chelatací zinečnatých iontů z jejího aktivního centra metodou rentgenové difrakce. Před samotnými difrakčními experimenty byly jednotlivé modifikace S1 nukleas lišící se přítomností nebo nepřítomností různých kovů v aktivním centru podrobeny měření jejich teplotní stability, aby se ověřilo, že případná chelatace nebo náhrada kovů zinku nemá zásadní vliv na nativní třírozměrnou strukturu proteinu. Poté následovaly krystalizační experimenty a jejich optimalizace metodou tzv. „seedingu“. Po úspěšné krystalizaci S1 nukleasy modifikované chelatací nebo přítomností nikelnatých iontů v aktivním centru byly provedeny difrakční experimenty. U dvou krystalů sběr difrakčních dat proběhl na synchrotronu BESSY II, Helmholtz Zentrum v Berlíně a jeden získaný krystal byl měřen na domácím zdroji Bruker D8 Venture (BTÚ AV ČR). Uchazeči se povedlo úspěšně vyhodnotit data z těchto experimentů a interpretovat výsledky. Metoda rentgenostrukturní analýzy je jednou z nejvýznamnějších metod v oboru strukturní biologie. Jedná o metodu získání struktury biomakromolekul s vysokým rozlišením až na úroveň atomů, a proto je zlatým standardem pro získávání třírozměrných struktur proteinů, proteinových komplexů nebo komplexů proteinů s DNA.

Práce je psaná velmi dobrou češtinou s minimem chyb či překlepů. Vypracování práce vyžadovalo od studenta jistě nemalé úsilí a trpělivost zejména při pěstování proteinových krystalů. Uchazeč si osvojil základní návyky práce v laboratoři s proteiny a proteinovými krystaly. V neposlední řadě se naučil vyhodnocovat a interpretovat difrakční data, což svou náročností dle mého názoru přesahuje úroveň bakalářské práce. Myslím si, že se jedná o velice kvalitní práci se zajímavým a důležitým tématem.

K práci mám několik kritických připomínek:

1. V textu celé práce je používán termín „chelace“ a „chelační“ místo „chelatace“ a „chelatační“. Při zadání obou termínů do Google člověk zjistí, že se používají oba dva a mají totožný význam, nicméně lze si také všimnout toho, že v odborné literatuře se téměř výlučně používá termín „chelatace“, kdežto „chelace“ najdeme především na e-shopech s doplňky stravy. Proto si myslím, že v této bakalářské práci, která dosahuje vysoce odborné úrovně, by bylo použití termínů „chelatace“ a „chelatační“ vhodnější.

2. Na straně 28 je zobrazena struktura S1 nukleasy. V popisu k obrázku chybí PDB kód dané struktury.

Dotazy k obhajobě:

1. V této práci byly krystalizovány proteinové částice S1 nukleasy v přítomnosti EDTA, která měla za úkol vyvázat zinečnaté ionty z aktivního centra. a v přítomnosti EDTA a molárního nadbytku nikelnatých iontů, což mělo za úkol nahradit ionty zinku v aktivním centru za nikelnaté ionty. Jaké je potenciální využití náhrady kovů v aktivním centru v průmyslu nebo medicíně?
2. Na základě čeho byly vybrány počáteční podmínky pro krystalizaci S1 nukleasy, konkrétní pufry, precipitanty a teplota?
3. Proč byla pro difrakci krystalů na synchrotronu zvolena vlnová délka 0,918 Å?
4. V práci na straně 34 bylo zmíněno, že u nukleasy S1 je předpoklad, že přidaná EDTA by měla způsobit změny nanejvýš v oblasti aktivního centra. Z čeho tento předpoklad vychází? Odebírání iontů kovů u proteinů často způsobuje dramatické změny v jejich třírozměrné struktuře.

Bakalářská práce dle mého názoru splňuje všechny podmínky, které jsou na ní kladeny. Doporučuji přijetí k obhajobě a hodnotím stupněm výborně (A).

V Praze dne 27.8.2021

RNDr. Olívia Petřalská, Ph.D.