

Ondřej Plíhal, Ph.D.

Institute of Microbiology, v.v.i.
Academy of Sciences of the Czech Republic
Laboratory of Functional Cytology



Vídeňská 1083
142 20 Prague 4
Czech Republic

tel. +420 24106 2357
fax +420 24106 2384

e-mail: plihal@biomed.cas.cz

url: <http://www.biomed.cas.cz/mbu/lfc/index.htm>

Oponentský posudek na diplomovou práci Alžběty Kalendové „Vlastnosti β -N-acetylhexosaminidas z vláknitých hub“

Předkládaná diplomová práce Alžběty Kalendové se zabývá charakterizací enzymu β -N-acetylhexosaminidas u dvou druhů vláknitých hub: *Penicillium oxalicum* a *Aspergillus oryzae*. Tyto dva strukturně i sekvenčně blízké enzymy mají řadu odlišných vlastností a jejich detailní porovnání bylo hlavním námětem této diplomové práce. K dosažení cíle práce bylo využito řady metodických přístupů. Enzym byl nejprve v několika krocích purifikován chromatografickou separací a následně podroben řadě testů pro stanovení kinetických parametrů pro vybrané substráty. Enzym byl dále deglykosylován pomocí glykosidasy Endo H a nativní i deglykosylovaný protein byly testovány na teplotní stabilitu a pH stabilitu v širokém rozmezí pH. Zajímavou částí práce je rovněž charakterizace enzymu pomocí elektroforézy za nativních podmínek s chromogenní detekcí, kdy lze pozorovat různé katalyticky aktivní formy β -N-acetylhexosaminidas.

Práce je standardně členěna a všechny části mají odpovídající rozsah. Úvod je zpracován velmi podrobně a odkazuje na řadu relevantních publikací. Experimentální část přináší nové výsledky o studovaných enzimech a přímé porovnání odkrývá řadu odlišností v pH optimu, teplotním optimu, chování deglykosylované formy enzymu a afinitě k vybraným substrátům.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. V části Úvod (kapitola 1.5.4.1) popisujete rozdělení propeptidů do dvou tříd. Na základě jakých vlastností je možné propeptid z *A. oryzae* zařadit do kategorie propeptidů druhé třídy?
2. Uvádíte několik funkcí fugálních β -N-acetylhexosaminidas. Kterou z nich lze považovat za hlavní?
3. Na str. 47 ukazujete průběh purifikace β -N-acetylhexosaminidas z *P. oxalicum* po jednotlivých chromatografických separacích. Po chromatografii na koloně Mono Q se objevuje posun od očekávané molekulové hmotnosti 65 kDa. Čím si tento posun vysvětlujete?
4. Není přesně uvedeno, jak byly prováděny pH stabilitní testy s deglykosylovaným enzymem. V jakých časových intervalech byla stabilita měřena? β -N-Acetylhexosaminidasa z *A. oryzae* je na rozdíl od enzymu z *P. oxalicum* po deglykosylaci

náchylnější k inaktivaci působením pH v kyselé oblasti. Uvažujete tento efekt při deglykosylaci β -N-acetylhexosaminidasy působením Endo H?

Výsledky nashromážděné v této práci přináší nové informace o vlastnostech β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* a *P. oxalicum*. Interpretace výsledků i jejich prezentace jsou na dobré úrovni. Na základě uvedených okolností doporučuji práci k obhajobě.

V Praze dne 12. května 2008

