

Posudek oponenta na diplomovou práci:

Bc. Michal Svoboda

studijní obor Biofyzikální chemie, PŘF UK v Praze

„Studium mechanismu účinku metallakarboranových inhibitorů HIV proteasy“.

Diplomová práce Michala Svobody se zabývá přípravou rekombinantních forem HIV proteasy, které budou následně využity pro studium interakcí s akompetitivním metallakarboranovým inhibitorem GB-110 pomocí metody EPR. Proteasové inhibitory dnes představují jeden z pilířů antiretrovirové terapie, nicméně díky rychlému vzniku mutantních forem, které jsou rezistentní vůči používaným inhibitorům, je zapotřebí neustále vyvíjet inhibitory nové. Důraz je kladen na vývoj inhibitorů schopných jednak inhibovat existující rezistentní varianty, ale i zpomalovat vznik nových rezistentních forem. A mezi takové sloučeniny patří i některé metallakarborany včetně látky GB-110, která byla vyvinuta v laboratoři školitele práce na ÚOCHB AV ČR.

V teoretické části diplomové práce je popsán úvod do problematiky struktury a životního cyklu viru HIV a následně jsou rekapitulovány výsledky dostupných biofyzikálně-chemických studií HIV proteasy. Detailně je popsána metoda EPR spektroskopie a princip selektivního spinového značení proteinů pro EPR měření. V experimentální části své práce se Michal Svoboda věnoval jednak přípravě řady expresních konstruktů HIV proteasy upravené pro specifické spinové značení, expresí a purifikací těchto proteinů a spinovému značení vybrané formy. Diplomant připravil dvanáct expresních konstruktů z nichž pět bylo exprimováno v bakteriích *E. coli* a vypurifikováno. U tří proteinů provedl kinetickou charakterizaci. Následně byl jeden z připravených proteinů úspěšně selektivně označen na Cys-55 pomocí spinové značky MTSL a byla realizována úvodní EPR měření. Finálně diplomant ověřil akompetitivní mechanismus inhibice HIV proteasy analogem látky GB-110, který bude v budoucnu použit k EPR experimentům s připravenou spinově označenou formou proteasy.

Předkládaná diplomová práce ukazuje, že autor získal řadu originálních poznatků a velmi dobře zvládl metody přípravy expresních konstruktů, exprese a purifikace rekombinantních proteinů v bakteriích *E. coli*, stanovení kinetických parametrů připravených enzymů a jejich kovalentního značení. K formální podobě práce nemám žádné připomínky, práce je napsána přehledně, pečlivě, s malým výskytem překlepů a výsledky jsou názorně prezentovány. Práce má standardní členění, rozsah jednotlivých kapitol je vyvážený. Diskuse získaných výsledků a citace použité literatury jsou adekvátní.

K předkládané diplomové práci mám několik drobných otázek do diskuse:

1. Mohl byste stručně vysvětlit proč je měření vzdáleností mezi spinovými značkami metodou EPR spektroskopie s fixní frekvencí v kombinaci se spinovým značením omezeno na vzdálenosti do 25 Å?
2. Existuje nějaké omezení pro měření vzdáleností mezi spinovými značkami při EPR měřeních v pulsním módu?
3. Připravil jste 12 různých konstruktů, ale exprimováno bylo pouze pět konstruktů. Jaká byla kritéria výběru těch pěti konstruktů?
4. Uvádíte, že velkým problémem při purifikaci byla autoproteolytická degradace enzymu. Bylo by možné pracovat s mutantou, která je katalyticky nefunkční, ale strukturně velmi podobná funkčním variantám enzymu (např. obsahující mutaci D25N)?

Závěrem konstatuji, že předložená práce Bc. Michala Svobody více než splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě a klasifikovat známkou výborně.

Doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Přírodovědecká fakulta UK
8. září 2011