

Posudek oponenta bakalářské práce

Jméno a příjmení uchazečky: **Aneta Šmídová**

Název práce: **Studium stability katalytické domény neutrální trehalasy pomocí diferenční skenovací fluorimetrie**

Obor: **Chemie životního prostředí, PřF UK v Praze**

Předložená bakalářská práce Anety Šmídové se zabývá studiem stability dvou konstruktů proteinu Nth1 v různých chemických podmínkách, kde stabilita konstruktů je vyjádřena hodnotou jeho teploty tání. Hlavním cílem bakalářské práce je optimalizace purifikačního protokolu těchto dvou různých konstruktů a určení optimálního pufru pro následné krystalografické studie těchto konstruktů, pomocí techniky diferenční skenovací fluorimetrie (DSF). Bakalářská práce je součástí projektu, jehož záměrem je získání krystalové struktury těchto dvou konstruktů kvasničné Nth1, tudíž nalezení optimálních podmínek pro krystalizaci obou konstruktů je klíčovým krokem projektu.

Bakalářská práce Anety Šmídové sestává ze tří hlavních částí. V první části autorka stručně shrnuje dosavadní poznatky o kvasničných trehalasách, proteinech 14-3-3, způsobech aktivace proteinu Nth1, což je jedna z kvasničných trehalas, a dále zmiňuje způsob výběru konstruktů pro krystalografii. Ve druhé části jsou pak popsány metody, kterými se autorce podařilo konstrukty připravit, a v poslední části Aneta Šmídová sepisuje své výsledky. Navíc Aneta Šmídová přikládá přílohy, ve kterých ukazuje výsledky predikce sekundární struktury Nth1 získané metodou PSIPRED, a tabulku přípravy pufrů pro techniku DSF.

K dosažení vytčených cílů musela Aneta Šmídová zvládnout metody exprese rekombinantních proteinů v bakteriích *E. coli*, následně pak metody purifikace proteinů a přesnou přípravu roztoků použitých pro techniku DSF, při které zjišťovala teplotu tání obou konstruktů. Oba konstrukty se Anetě podařilo připravit v dostatečném množství a určit roztok, ve kterém jsou jednotlivé konstrukty nejstabilnější.

Aneta Šmídová splnila všechny vytčené cíle své bakalářské práce a seznámila se s novými technikami práce v laboratoři. Práce je psána přehledně, s drobnými překlepy a formulačními nepřesnostmi, které jsem již s autorkou konzultovala. Citované prameny jsou dostatečné a relevantní, citace jsou sjednocené. K formální stránce předkládané bakalářské práce mám jen drobné připomínky a několik upřesňujících dotazů:

Připomínky:

1. Autorka by si měla dávat pozor na psaní výrazů jako „sekundární sekvence“ (str. 15), „gelová chelatační chromatografie“ (str. 45), „plastovým kapátkem“ (str. 22) namísto „Pasteurovou pipetou“, „PRISPRED“/ „PRISPREDview“ (str. 15, 51) namísto „PSIPRED“/ „PSIPREDview“ apod.
2. Na str. 36 se autorka odkazuje na tabulku 5.1 ze str. 37, ovšem na str. 37 je pouze tabulka 5.3, u které chybí název a popis. Bylo by vhodné tabulky popisovat.
3. Na str. 55 se nachází tabulka k zápisu vypůjčovatelů. Bylo by vhodné zarovnat text hlaviček v tabulce doleva, nebo doprostřed, aby nedocházelo k rozdělování slov.

Dotazy:

1. Na straně 15 se zmiňujete, že ke zjištění sekundární struktury Nth1 jste použila metodu PSIPRED (Predict Secondary Structure). Mohla byste stručně vysvětlit, jak tato metoda funguje a na základě čeho předpovídá sekundární strukturu proteinů?

2. Metodou PSIPRED jste předpověděla sekundární strukturu Nth1. Mohla byste stručně vysvětlit, na základě jakých faktů o predikované sekundární struktuře jste vybrala právě konstrukty Nth1 100 - 751 a Nth1 153 – 751 jako vhodné pro krystalografické studie?
3. Na straně 30 popisujete princip techniky diferenční skenovací fluorimetrie. Jak si vysvětlujete, že použité barvivo SYPRO začalo fluoreskovat až po navázání na hydrofobní oblasti proteinu a jeho fluorescence nebyla zaznamenána už tehdy, když se nacházelo nenavázané volně v roztoku?

Závěrem mohu konstatovat, že předložená práce Anety Šmídové je i přes nedostatky kvalitní a zcela splňuje požadavky kladené na bakalářskou práci. Studentka prokázala schopnost vědecky pracovat a prezentovat dosažené výsledky. Proto navrhuji tuto práci uznat jako práci bakalářskou a hodnotit známkou výborně.

V Praze dne 28. 8. 2014

Mgr. Miroslava Kacířová
Přírodovědecká fakulta, UK