KATEDRA FYZIKÁLNÍ A MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE PŘF UK V PRAZE

RNDr. Tomáš Obšil PhD.
Tel. 221951303
E-mail: obsil@natur.cuni.cz

Posudek oponenta na bakalářskou práci:

Pavla Strnadová

obor Biochemie, PřF UK v Praze

„Inserty v HIV protease – nový typ rezistence vůči antiretrovirové léčbě".

Bakalářská práce Pavly Strnadové se zabývá studiem mutantních forem HIV proteasy, které obsahují tzv. inserty. Přímý dopad těchto insertů na protivirovou léčbu a vznik rezistence vůči inhibitorům není dosud znám. Autorka práce si vytkla dva hlavní cíle. Prvním cílem byla literární rešerše na téma HIV viru a možných terapeutických postupů onemocnění AIDS s důrazem na strukturu a funkci virových proteinů HIV reverzní transkriptasy a HIV proteasy a problému rezistence těchto dvou enzymů. Druhým cílem byla příprava mutantní verze HIV-1 proteasy (v práci označená jako DB1), která obsahuje řadu bodových mutací a zároveň z ní byl odstraněn insert (zbytek Leu) v pozici 33. Pavla Strnadová provedla expresi tohoto proteinu v bakteriálním expresním systému. Dále pokračovala izolací a přečištěním inkluzních tělísek, renaturací HIV-1 proteasy a purifikací renaturovaného proteinu. U získaných frakcí finálně provedla stanovení enzymové aktivity. Výsledkem této části práce bylo 300 μg čistého proteinu a dalších 400 μg s nižší čistotou.

Předkládaná bakalářská práce ukazuje, že se autorka seznámila s literaturou související se studovanou problematikou a velmi dobře zvládla metody exprese, renaturace, purifikace a stanovení aktivity HIV-1 proteasy. K formální podobě práce nemám žádné větší připomínky, práce je napsána přehledně, pečlivě a výsledky jsou názorně prezentovány. Diskuse získaných výsledků a citace použité literatury je také adekvátní.

K předkládané bakalářské práci mám jen dvě malé formální připomínky a tři otázky do diskuse:

Formální připomínky.

Na str. 24 při popisu insertu, který obsahoval dva leucinové aminokyselinové zbytky by bylo vhodnější použít termín „leucinový aminokyselinový zbytek" místo termínu „molekula leucinu". Molekulou (resp. makromolekulou) je zde celá proteasa, která je tvořena aminokyselinovými zbytky.

Citace č. 24 na str. 38 není příliš specifická. Jedná se o časopis nebo knihu či sborník?

Otázky do diskuse:

Mohla by jste porovnat výtěžek vaší purifikace s výtěžky, kterých dosahují vaši kolegové v laboratoři s jinými verzemi HIV-1 PR.

V práci popisujete, že inserty pravděpodobně vznikají v důsledku „přetažení" a „smeknutí" reverzní transkriptasy. Dále jsem z práce usoudil, že umístění insertů není zcela náhodné, ale u obou proteinů se preferenčně nacházejí v určitých oblastech. Znamená to tedy, že ono zmíněné „přetažení" a „smeknutí" reverzní transkriptasy není jev náhodný, ale dochází k němu jen v určitých oblastech genů? Jestli ano, existuje pro to nějaké vysvětlení?

V práci v kontextu s terapií onemocněné AIDS podrobně popisujete dva enzymy HIV viru – reverzní transkriptasu a proteasu. Z jakého důvodu nediskutujete HIV integrasu? Existují nějaké inhibitory tohoto enzymu?

Závěrem konstatuji, že bakalářská práce Pavly Strnadové více než splňuje všechny požadavky kladené na práce tohoto typu a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě.

RNDr. Tomáš Obšil PhD.
Přírodovědecká fakulta UK
13. června 2006