

## Oponentský posudek diplomové práce

### **Rašid Kamal: Strukturní studie mutantu S6A matrixového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru**

V předložené diplomové práci se student zabýval řešením struktury mutantního matrixového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru a jeho porovnáním s divokým typem. Cílem práce bylo objasnit mechanické vlastnosti N-koncové oblasti tohoto proteinu, která je posttranslačně modifikovaná myristoylací a je velmi důležitá z hlediska funkce tohoto proteinu, zejména pro jeho vazbu na membránu hostitelské buňky. Díky tomu by získané výsledky mohly přispět nejen k pochopení molekulárního mechanismu myristoylového přepínače, ale i k prohloubení pochopení vztahů mezi strukturou a funkcí matrixového proteinu retrovirů a jejich důsledků pro životní cyklus retrovirů.

Diplomantovi se podařilo připravit izotopově značený, mutantní matrixový protein v dostatečném množství a čistotě pro jeho studia pomocí NMR, což je velmi často dost obtížný úkol. Pomocí metody NMR byly úspěšně přiřazeny chemické posuny atomů proteinové páteře a získaná data byla porovnána s daty pro divoký typ matrixového proteinu. Takto byly tedy identifikovány změny proteinu v okolí mutace. Byla stanovena střední kvadratická odchylka pro soubory vodíků  $\alpha$  studovaného mutantu a porovnána s dalšími mutanty proteinu a s jeho divokým typem. Byl proveden i výpočet indexu CSI a byla odhadnuta sekundární struktura studovaného proteinu. Metodou RCI byly vypočteny parametry uspořádanosti proteinu. Závěrem bylo zjištěno, že N-terminální oblast mutantního proteinu je destabilizována a byly předpovězeny i jeho další možné strukturní změny.

#### **K předložené práci mám několik výhrad, připomínek a doporučení.**

Celá diplomová práce je spíše stručnější, například teoretická část obsahuje pouze základní data a nezachází moc do detailů. V rešerši postrádám více novějších dat o významu matrixového proteinu v životním cyklu retrovirů, například i ohledně jeho možných interakcí s dalšími buněčnými složkami. Byly například předpovězeny i jeho interakce s virovou genomovou nukleovou kyselinou a podobně. Obecně v práci je citováno pouze minimum prací o matrixovém proteinu pocházejících z posledních tří let. V teoretické části bych uvítal i uvedení aminokyselinové sekvence studovaného matrixového proteinu, se zvýrazněním jeho důležitých částí a aminokyselin. Také obrázky v této části jsou často nepřehledné a nedostatečně popsány, například hned v obrázku č.1 chybí popis nukleokapsidového proteinu a virových enzymů, které tam jsou uvedeny jako barvené tečky.

Autor popisuje jednotlivé strukturní proteiny Mason-Pfizerova opičího viru, bylo by opět pro lepší přehlednost dobré uvést i schéma strukturního polyproteinu Gag M-PMV, jehož je matrixový protein součástí a neuvádět jednotlivé proteiny na přeskáčku, ale tak jak jsou uspořádány postupně v rámci Gag.

Občas se zdá, jakoby byla celá práce psána ve spěchu, je v ní obecně zbytečně mnoho překlepů a nejasností, či nepřesných formulací, které jinak vcelku pěkné a kvalitní práci dodávají poněkud negativní nádech, jako příklad bych uvedl kap. 4.2.1.1, nazvanou PCR mutagenese. Zde není v popisu reakční směsi pro PCR ani zmínka o koncentraci hořčičných iontů, je téměř jistě chybně uvedena denaturace DNA po dobu 40 min a hybridizace primerů 40 min, není ani jasné, jaké bylo použito množství templátové DNA na reakci, protože je uveden pouze objem DNA, nikoliv však už její koncentrace. Tyto a podobné chyby se v práci objevují na více místech.

Více prostoru bych věnoval i diskusi získaných výsledků, jejich významu a případně i nastínění další navazující práce.

**Na diplomanta mám několik dotazů:**

Kolikrát byla nezávisle měřena jednotlivá NMR data, pocházející například z různých purifikací studovaného proteinu?

Jak si vysvětlujete fakt, že se nepodařilo přiřadit žádný signál glutamátu na pozici 9 studovaného proteinu?

V první tabulce v příloze chybí výsledky u chemických posunů aminokyselin č. 63 a 80. Je k tomu nějaký důvod?

Při studiu mutantu došlo ke změně chemických posunů nejen v okolí vlastní mutace ale i na pozici fenylalaninu 34. Můžete to blíže okomentovat?

Byla předpovězena strukturní změna studovaného proteinu na úrovni smyčky mezi helixy 2 a 3. Na základě struktury divokého typu proteinu mi však není moc jasné jak může souviset mutace S6A s touto změnou. Máte pro to nějaké vysvětlení?

Plánujete dále pracovat na řešení terciární struktury proteinu?

Budete v budoucnu studovat vliv mutace S6A na myristoylaci tohoto proteinu, např. *in vitro*? Jsou známa nějaká biologická data ohledně tohoto mutantu? Byl kromě strukturních studií sledován i funkční význam a projev této mutace v rámci životního cyklu celého viru, například v tkáňových kulturách?

Přes všechny uvedené výtky se jedná o práci kvalitní, diplomant prokázal schopnost samostatné vědecké práce, která má důležitý význam při studiu životního cyklu retrovirů. V průběhu práce si diplomant osvojil a zvládl mnoho různých technik a postupů. Práci poté i úspěšně sepsal a získané výsledky diskutoval. Doporučuji ji tedy k obhajobě a hodnotím ji známkou 2.

V Praze dne 26. 5. 2011

Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.