



ÚOCHB AV ČR

ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE
AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC

Posudek na diplomovou práci Bc. Anety Šmídové nazvanou Příprava a charakterizace neutrální trehalasy pro strukturní studie.

Ve své práci se Bc. Šmídová zabývala biochemickou a strukturní charakterizací neutrální kvasinkové trehalasy, enzymu zapojeného do metabolismu sacharidů, konkrétně hydrolýzy disacharidu trehalosy. Finálním cílem práce byly krystalografická charakterizace enzymu. Za tímto účelem navrhla diplomantka řadu konstruktů a i mutantů enzymu, z nichž bylo sedm úspěšně exprimováno a purifikováno. Byla studována stabilita a aktivita těchto konstruktů. Dva z konstruktů se podařilo úspěšně vykristalizovat za přítomnosti substrátu trehalosy s rozlišením asi 3 Å a u jednoho z konstruktů byla i vyřešena struktura s navázanou trehalosou.

Jsem přesvědčen, že se jedná o velmi kvalitní práci s řadou výborných výsledků, které budou v budoucnu jistě publikovány ve špičkovém časopise. Diplomovou práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

K práci bych měl několik poznámek a dotazů, které plynou z mého zájmu o tuto problematiku. Budu rád, pokud bude při obhajobě čas, když mi na některé z nich kandidátka odpoví.

V úvodu je zmíněno, že inhibitory trehalasy by mohly být užitečné jako selektivní insekticidy proti létavému hmyzu. Mohlo by tedy být užitečné vyřešit struktury trehalasy např. z mušky *Drosophila*. Proč byla studována právě kvasničná trehalasa?

Je známo, jak se liší aktivní místo neutrální a kyselá trehalasy?

V práci je zmíněno a experimentálně podpořeno, že jedna trehalasa váže protein Bmh v poměru 1:2. Na obrázku 2.5 je ale znázorněna jen jedna molekula Bmh. Jak by se tedy vážala druhá molekula?

V legendě k obrázku 2.9 je zmíněno, že zobrazené struktury obsahují inhibitory. Je tomu tak skutečně? Nepodařilo se mi je najít.

Sekvence trehalasy obsahuje 4 cysteiny. Dá se předpokládat, že budou tvořit disulfidické můstky. V které fázi exprese/purifikace podle Vás dochází k jejich tvorbě?

TEV proteáza štěpí na N-konci glycinu. Ani v jednom z konstruktů vytvořených v této práci však N-koncový glycin není. Znamená to, že byl k sekvenci přidán?

Konstrukt 153-751 takřka postrádá enzymatickou aktivitu. Protein Bmh1 se nejspíše váže na aminokyseliny 660-710. Jaká je tedy úloha sekvence 1-152?

Vazebné izotermy vazby trehalosy na konstrukty na obrázcích 6.38-6.43 mají rozdílný charakter (stoupají či klesají). Co je toho příčinou?

Z Tabulky 6.3 se může zdát, že konstrukty mají vyšší afinitu k trehalose než WT enzym. Jsou tyto rozdíly signifikantní, a pokud ano, co je toho příčinou?

V Praze 26.8.2016, Jří Jiráček