

**Posudek školitelky na diplomovou práci Aleny Guzanové:  
Studium mutací v rozpoznávací podjednotce HsdS restriktivně-modifikačního systému  
EcoR124I**

Studentka přírodovědecké fakulty UK Alena Guzanová pracovala na své diplomové práci v Laboratoři molekulární genetiky bakterií Mikrobiologického ústavu AV ČR. Téma její práce se týkalo restriktivně - modifikační enzymů Typu I, které jsou zajímavým modelem pro studium interakcí protein-protein a protein-DNA. Jsou považovány za molekulární motory, které za spotřeby ATP produkují pohyb a sílu a tím se nabízí jejich uplatnění v bionanotechnologii. Skládají se ze tří podjednotek, kódovaných třemi geny *hsdR*, *hsdM* a *hsdS*. Produkty všech tří genů jsou nezbytné pro zabezpečení restriktivní funkce, zatímco pro modifikaci (methyloaci) jsou postačující pouze produkty genů *hsdM* a *hsdS*. Klíčovou úlohu má podjednotka HsdS zodpovědná za rozpoznání specifického místa na DNA v procesech modifikace i restrikce.

Cílem diplomové práce bylo přispět k výzkumu regulace funkce těchto komplexních enzymů na základě změněné schopnosti vazby podjednotek. V naší laboratoři jsme vytvořili soubor mutací v DNA rozpoznávací podjednotce HsdS. Srovnáním sekvenčních údajů s fenotypovým projevem a s výsledky biochemické analýzy *in vitro* chceme identifikovat významné aminokyselinové zbytky zapojené v interakci podjednotek nebo ve vazbě na DNA. Zajímají nás zejména ty mutace, které výrazně změni funkci enzymu – nová specifita, odstranění endonukleasové funkce.

Diplomantka dostala za úkol analyzovat bodové mutace v konzervovaných doménách podjednotky HsdS: Lys 184 Asn v centrální doméně, Lys 384 Asn v C-koncové doméně a mutantu s oběma mutacemi. Tyto mutace jsou zajímavé tím, že v predikovaném modelu podjednotky HsdS jsou umístěné zrcadlově proti sobě.

Alena Guzanová si v průběhu diplomové práce osvojila řadu metod od klasických mikrobiologických technik přes metody molekulární genetiky až po biochemické přístupy. Oceňuji zejména zvládnutí komplementační analýzy založené na kompetici podjednotek HsdS příbuzných systémů EcoR124I a EcoR124II. Od analýzy *in vivo* pokračovala přes purifikaci vybraných proteinů k analýze *in vitro*. Její výsledky zcela potvrdily neklasický fenotyp  $r^- m^+$  mutantních enzymů a tím i význam konzervovaných domén podjednotky HsdS na sestavení methylasy, případně na přímou vazbu s restriktivní podjednotkou HsdR. Tyto výsledky jsou zcela v souladu s nedávno publikovaným modelem methylasy M.EcoR124I a budou podkladem pro další analýzu zejména vazebných schopností mutantních enzymů na DNA.

Navíc se jí podařila purifikace standardní MTasy v takovém množství a kvalitě, že bude předána na krystalizaci a mutantní MTasa už byla poskytnuta spolupracujícímu pracovišti v Drážďanech na analýzu translokace pomocí magnetické pinzety.

Diplomantka jako studentka učitelského směru byla dosti limitována časem, který mohla věnovat diplomové práci vedle povinné pedagogické praxe, takže práci věnovala i řadu víkendů. Přesto, nebo právě proto projevovovala značný zájem o studovanou problematiku, což se odrazilo v přístupu k experimentální práci a v aktivním studiu doporučené literatury. Alena Guzanová mě přesvědčila natolik o svých schopnostech, že jí byla nabídnuta možnost pokračovat v práci formou doktorandského studia a podílet se na EU projektu postaveném na využití R-M enzymů jako molekulárních motorů v nanotechnologiích.

V Praze 29.5.2007

RNDr. Marie Weiserová, CSc.