

Oponentský posudek bakalářské práce

Krystalizační studie proteinu Tt81 z *Thermococcus thioreducens*

Autorka: Kristýna Rejzková

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta

Hlavním tématem práce je podrobné studium krystalizačních podmínek proteinu Tt81 *Thermococcus thioreducens*, který by měl patřit do nadrodiny halogenaciddehalogenas, i když, jak je uvedeno v práci, to není zatím zcela prokázáno. Jedná se o nově objevenou tzv. putativní halogenaciddehalogenasu. Tyto látky je možné použít při ochraně životního prostředí, pro biodegradaci různých halogenovaných polutantů či jako biosenzorů halogenovaných sloučenin. Téma práce je tedy vysoce aktuální.

Cíle práce jsou jasně formulovány, zvolená metodika je velmi vhodná a jasně popsána a celkový postup řešení správný.

V Literárním přehledu se autorka věnuje problematice krystalizace proteinů od počátku v typickém postupu, tj. principu krystalizace, testům prováděným před krystalizací, zejména za účelem stanovení vhodné koncentrace proteinu, a pak zejména přehledu krystalizačních metod. Tato část je napsána velmi pěkně, stručně a výstižně. Následující partie je věnována faktorům ovlivňujícím krystalizaci, což je záležitost velmi komplikovaná, takže lze těžko dát nějaká obecná doporučení. Důležitá je zmínka o důvodu, proč by se struktura biomolekuly určená z krystalu neměla lišit od struktury stejné molekuly v roztoku. Následující část popisuje krystalizační testy pomocí několika způsobů, tzn. charakterizace získaných krystalů a odlišení krystalů proteinů od krystalů solí, které také mohou při procesu vzniknout. Zmíněna je strukturální databáze proteinů PDB. Závěr úvodní části je věnován charakteristice a možným aplikacím halogenaciddehalogenas a studované putativní halogenaciddehalogenase.

V části třetí autorka popisuje použité metody. V prvním kroku byl zvolen lysozym, který je známý a dobře krystalující. Pochopil jsem, že účelem bylo především naučit se dobře celou metodiku. V části čtvrté jsou uvedeny příslušné výsledky. Bylo by dobré je nějakým způsobem shrnout, kromě detailního rozboru na str. 35-39. To znamená, zda bylo (nebo nebylo) potvrzeno očekávané chování resp., jestli z těchto experimentů vyplynuly nějaké závěry např. ohledně krystalizačních metod či zda toto posloužilo opravdu především ke zvládnutí metodiky studentkou.

Hlavní cílem byla ovšem krystalizace zmíněného proteinu Tt81, počínaje přípravou, klonováním, purifikací a testováním čistoty pomocí gelové elektroforézy. Pro krystalizaci byla použita sada komerčně dostupných činidel z Hampton Research a metody sedící kapky a mikrokystalizace pod olejem. V několika tabulkách jsou uvedena detailní schemata krystalizačních destiček. Pro zlepšení čtivosti práce by bylo vhodnější je přesunout do dodatku. U získaných krystalů byly provedeny testy, zda se jedná o krystaly proteinů a to mechanickým testem jehlou a absorpcí barviva. Pro porovnání byly vypěstovány i krystaly několika anorganických sloučenin. Zásadní výsledky jsou uvedeny na str. 39-47. Podařilo se nalézt vhodné podmínky pro krystalizaci uvedeného proteinu a ověřit kvalitu krystalu i pomocí rtg difrakce s použitím synchrotronového záření. Vcelku bylo testováno 376 různých krystalizačních podmínek a je uvedeno, že vhodné krystaly vznikly ve 27 případech z nich.

V diskuzi je spíše uvedeno určité shrnutí získaných výsledků a přidána část o halogenaciddehalogenasach v databázi PDB. Zde mně není jasná přímá souvislost s hlavním tématem práce. Shrnutí pak je dále provedeno i v závěru a lze jasně konstatovat, že cíle práce byly splněny.

K práci bych měl několik otázek resp. připomínek.

1. Je zmíněna strukturní databáze PDB. Dostupné jsou i krystalizační databáze např. <http://xpdb.nist.gov:8060/BMCD4/index.faces>. Mělo by jejich použití v daném případě nějaký smysl?
2. V práci je zmíněno, že kromě krystalů proteinů mohou vznikat i anorganické krystaly a proto je třeba provádět zmíněné testy. Mám za to, že použité dva testy jsou ovšem oba destruktivní a dané krystaly pak již nelze použít. Je pak možné jednoznačně říci, že analogické krystaly v jiném vzorku jsou krystaly proteinů? Mám na mysli, jestli je možný případ, že za konkrétních podmínek vzniknou v jednom vzorku obojí krystaly.
3. Na straně 10 je uvedeno, že se krystaly uchovávají ve tmě. Má tedy světlo vždy destruktivní vliv?
4. Mechanický test. Není možné, že se i některé anorganické krystaly snadno rozpadnou?
5. Separátně byly pěstovány některé anorganické krystaly. Zřejmě se spíše jednalo o ilustrativní dodatek bez přímé souvislosti se studovanou krystalizací. Nebyly nalezeny anorganické krystaly i při studiu krystalizace lysozymu a Tt81?
6. U tabulky 28 je uvedeno, že nejlepších výsledků (krystalky vhodné pro difrakci) bylo dosaženo v destičkách V, VI, VII, IX. Na obr. 14 a 15 jsou přesto značné rozdíly. Platí to např. i o obr. 15C (VIII)? Pro který ze vzorků byl získán difrakční záznam (obr. 23)?
7. Lze upřednostnit v daném případě některou ze dvou úspěšných krystalizačních metod?

Na str. 10 je uvedeno „použití *vysokofrekvenčních zdrojů*“ v souvislosti se synchrotronovým zářením. Použité vlnové délky (tedy frekvence) jsou analogické laboratorním zdrojům. Přesnější je tedy napsat, že se jedná o vysoce intenzivní zdroje.

Práci s odbornou literaturou hodnotím jako adekvátní. Autorka si vybrala způsob citací jmény s jejich abecedním řazením na konci. Uvádí téměř padesát citací. Nezaznamenal jsem žádnou nekonzistenci. Práce je jazykově zpracována na velmi dobré úrovni, téměř bez chyb. Formulace jsou jasné a věcně správné, formální zpracování velmi pěkné. Obecně působí práce, přes dílčí připomínky, velmi dobrým dojmem a navrhuji ji hodnotit stupněm výborně.

V Praze 18. 5. 2016


prof. RNDr. Radomír Kužel, CSc.