

Oponentský posudek k diplomové práci

Autor práce: Jan Tykvart

Název práce: One-step purification of recombinant glutamate carboxypeptidase II and its homolog

Diplomová práce Jana Tykvarta vypracovaná pod vedením Doc. RNDr. Jana Konvalinky, Csc. na Katedře biochemie PřF UK se zabývá rekombinantní přípravou lidské glutamátcarboxypeptidasy II (GCPII) a jejího homologu (NAALADaseL) a následnou optimalizací její purifikace pomocí afinitní chromatografie s využitím biotinové kotvy a streptavidin-mutein matrice.

Práce zahrnuje rozmanité metody manipulace s DNA při tvorbě expresních vektorů pro cílové proteiny, dále jejich rekombinantní expresi pomocí transfekce S2 Schneiderových buněk *Drosophily* a konečně následnou afinitní purifikaci získaných proteinů spojenou s metodami imunodetekce a stanovení enzymové aktivity, v neposlední řadě také proteinové krystalografie. To také přesně a zcela odpovídá cílům předkládané práce, kterých tak bylo dosaženo, a to včetně mimořádně zdařilého úvodního cíle, kterým bylo zpracování literárního úvodu k práci zaměřeného na afinitní purifikaci proteinů.

Diplomová práce je psána v jazyce anglickém a po formální stránce je velice pečlivě zpracována, obsahuje pouze minimální množství překlepů, jazyková stránka je z hlediska jazykové úrovně oponenta také naprosto v pořádku. Jednotlivé oddíly práce jsou přehledně členěny a je užitečné, že v textu se často vyskytují křížové odkazy na jednotlivé související pasáže textu. Práce končí poměrně obsáhlou diskuzí, která zasazuje získané výsledky do širšího výzkumného pozadí a dává nahlédnout i slepých uliček, které bylo třeba při vypracování práce překonat.

Celkově tedy považuji předkládanou diplomovou práci za vynikající a doporučuji ji k obhajobě.

Otázky:

- 1) Použil jste metodu stabilní transfekce buněčné linie, z práce však zcela jasně nevyplývá její mechanismus, antibiotická rezistence jednotlivých použitých plazmidů či metoda selekce rezistentních klonů – mohl byste stručně vysvětlit sled jednotlivých kroků postupu a jejich význam?
- 2) Neuvažoval jste o zařazení dodatečného kroku purifikace připravených proteinů a pokud ano, jakého?
- 3) Vedle vytvoření robustního purifikačního protokolu lze za jeden z hlavních výsledků Vaší práce považovat nepotvrzení dipeptidyl peptidasové aktivity IV pro homolog NAALADaseL – v diskuzi jsem však postrádal zhodnocení možného vlivu odlišné N-glykosylace buněk *Drosophily* na tuto aktivitu, ačkoli je známo, že glykosylace je pro aktivitu příbuzné GCPII nezbytná – anebo lze vliv tohoto rozdílu na enzymovou aktivitu vyloučit?

V Praze dne 22. 5. 2009

Mgr. Ondřej Vaněk, v.r.