

POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Předložená diplomová práce Bc. Salome Kylarové nazvaná „ Příprava a charakterizace vazebných partnerů fosducinu „, se zaměřila na problematiku týkající se interakcí fosducinu a proteinu SUG1 a v menším rozsahu i transkripčního faktoru CRX. Fosducin patří mezi významné regulátory cGMP kaskády světlocitlivých buněk sítnice. Protein SUG1 se účastní nejen procesů spojených s degradací jeho interakčních partnerů, ale zasahuje i do neproteolytických dějů založených na regulaci funkce mnohých transkripčních faktorů nebo jaderných receptorů. Sdílí konzervované úseky s ATP- dependentními DNA/RNA helikásami a tudíž se dá předpokládat, že může hrát určitou úlohu v metabolismu specifických mRNA.

Stěžejní část práce byla soustředěna na přípravu dostatečného množství SUG1 proteinu v rozpustné a stabilní formě. Byly připraveny čtyři expresní konstrukty, jejichž produkty jsou různé fúzní varianty tohoto proteinu. Hlavní pozornost byla věnována hledání optimálních podmínek pro jejich expresi a purifikaci a pro další experimenty zabývající se jejich biofyzikálními vlastnostmi.

Dílními cíli předložené práce, které byly všechny splněny, bylo vyvinutí a optimalizace expresního a purifikačního protokolu proteinu SUG1. Byly klónovány expresní konstrukty tohoto proteinu v expresních plasmidech pET-29b, pRSFduet-1 a pGEX-4T-1. Expres těchto konstruktů byla prováděna v expresních kmenech bakterií BL21 nebo Rosetta a jejich purifikace afinitní a gelovou permeační chromatografií. Protein SUG1 je dostatečně stabilní při vystavení teplotě 18 °C v časové periodě deseti dnů. Vnější struktura tvořených částic byla charakterizována měřením dynamického rozptylu světla, získaná data ukázala jejich definované uspořádání a sférický tvar. Podobné vlastnosti byly popsány již u jeho archeálního homologu PAN. Na základě jeho struktury budou připraveny další expresní konstrukty zkrácených fragmentů proteinu SUG1, kde se dá očekávat snížení jeho nadměrné oligomerizace.

K úspěšnému splnění vytčených cílů musela Salome Kylarová zvládnout rozličné metody z molekulární biologie (klónování, PCR atd.), purifikaci bílkovin, biofyzikální metody jako je dynamický rozptyl světla apod.

Diplomová práce Salome Kylarové je formálně i jazykově na velmi dobré úrovni s vyváženou proporcí mezi teoretickou a výsledkovou částí. Výsledky a diskuze zabírají dostatečnou část z celkového počtu stránek. Citovaná literatura je použita v dostatečném množství odkazů. Práce je napsána velmi pečlivě a s minimem překlepů.

K diplomové práci mám následující dotazy:

- 1) Je něco známo o vazebném místě na SUG1, kterým se váže na fosducin?
- 2) Byly zjištěny analoga SUG1 rovněž i v jiných modelových genomech např. u rostlin?
- 3) Jsou vhodné k detekci interakce fosducin a SUG1 i metody jako je třeba izotermální titrační kalorimetrie nebo povrchová plasmonová resonance?
- 3) existují nějaké „knock out“ studie genu SUG1 a jak se případně projevují?

Závěrem mohu konstatovat, že předložená práce Salome Kylarové je velmi kvalitní a zcela vyhovuje požadavkům kladených na diplomovou práci. Studentka prokázala schopnost samostatně pracovat a prezentovat získané výsledky. Navrhuji tuto práci uznat jako práci diplomovou a hodnotím jí známkou výborně.

V Praze dne 17.5. 2013

ing. Jan Teisinger CSc
FGÚ AVČR , v.v.i.