

Posudek oponenta na bakalářskou práci

Terezy Šafránkové

„Cílená mutagenese fosforylačních míst Forkhead transkripčního faktoru FoxO4“

Posuzovaná bakalářská práce obsahuje 46 stran textu. Textová část se skládá z 8 kapitol, v nichž autorka postupně pojednává o biochemickém pozadí studovaných proteinů (forkhead transkripční faktor FoxO4 a 14-3-3 protein), cílech bakalářské práce, použitých experimentálních metodách (práce s plasmidovou DNA, cílená mutagenese a test exprese proteinů v bakteriálním expresním systému) a nakonec provádí výčet dosažených výsledků a jejich diskuzi.

Bakalářská práce se zabývá přípravou dvou mutantních verzí forkhead transkripčního faktoru FoxO4. Protein FoxO4 je důležitý transkripční aktivátor a mechanismus jeho regulace je stále nejasný. Vazba regulačního 14-3-3 proteinu se zdá být zcela zásadní jak pro regulaci DNA vazebných vlastností FoxO4, tak i pro regulaci jeho buněčné lokalizace.

Dějová linka práce je následující:

- 1) Autorka nejdříve izolovala plasmidovou DNA obsahující gen FoxO4 a pomocí restrikční analýzy ověřila přítomnost insertu.
- 2) Dále metodou PCR provedla mutagenesi dvou aminokyselinových zbytků, které jsou fosforylační místa a slouží jako vazebná místa pro regulační 14-3-3 protein.
- 3) Po úspěšně provedené mutagenesi Tereza Šafránková provedla expresní test s jedním z mutantů a ukázala, že bakterie *E.coli* tento protein produkují.

K předložené práci mám následující otázky:

- 1) Můžete zhodnotit obecný význam fosforylace na Ser či Thr.
- 2) Proč jste pro mutagenesní PCR reakci použila velmi drahou Pfu-turbo polymerasu a ne podstatně levnější Taq-polymerasu?
- 3) Proč je FoxO4 exprimován jako fúzní protein s GST? Má to nějaké výhody?

Po prostudování diplomové práce Terezy Šafránkové chci konstatovat, že jde o práci kvalitní, ve které autorka prokázala, že úspěšně zvládla řadu experimentálních technik molekulární biologie a je schopna samostatné práce v laboratoři. Práce vedla k získání originálních výsledků. Autorkou připravené mutanty budou použity v dalším studiu mechanismu regulace FoxO4. Práce působí kompaktním dojmem, kvalita formálního zpracování je vysoká. V práci se sice vyskytuje pár neobratných formulací a překlepů, ale ty nijak nesnižují kvalitu práce. Domnívám se proto, že bakalářská práce Terezy Šafránkové splňuje všechny předpoklady kladené na práci tohoto typu a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 14. 9. 2006

Ing. Jan Teisinger, CSc.
FGÚ AV ČR