

Oponentský posudek bakalářské práce

Nicola Koupilová: Příprava lidské Ca²⁺/kalmmodulin-dependentní proteinkinasy 2 fosforylované na Ser100 a Ser511

Předložená bakalářská práce Nicoloy Koupilové se zabývala studiem lidského proteinu CaMKK2, který hraje důležitou roli ve vápníkové signální dráze. Pod nenápadným názvem práce se skrývá exprese a purifikace celkem 5 různých proteinů (CaMKK2, CaM, 14-3-3 γ ΔC, TEV proteasy a cAMP dependentní proteinkinasy A) a jejich následné experimentální využití. Vlastním jádrem práce pak byla optimalizace fosforylačního protokolu CaMKK2. Získaný finální komplex CaMKK2 a 14-3-3 γ ΔC, případně navíc ještě spolutvořený kalmmodulinem, byl dále zkoumán i pomocí analytické ultracentrifugace.

Předložená práce má 64 stran, 47 obrázků, 26 tabulek a je členěna klasickým způsobem. Seznam literatury obsahuje 49 citací. Text je psán srozumitelně a čtivě, občas možná mírně neobratně. To ale jistě lze u bakalářské práce pochopit. Naprosto úctyhodné je množství experimentů, které byly vykonány v oblasti exprese a purifikace jednotlivých proteinů. Je-li jedním z účelů bakalářské práce získání zkušeností v jednotlivých experimentálních technikách, byl cíl v tomto směru naplněn jistě bohatě. Významné zkušenosti si kandidátka jistě odnesla i z vyhodnocování a optimalizování fosforylačního protokolu.

K práci mám několik poznámek:

- 1) Na str. 23 je zřejmě chybně uvedena jednotka extinkčního koeficientu.
- 2) Na str. 25 píšete o „3 μ l plasmidové DNA s vektorem“. Asi by zde byla na místě lepší formulace; navíc údaj o objemu bez uvedení koncentrace není příliš směrodatný.

K práci mám tyto dotazy:

1. Prezentované eluční profily z chromatografií (např. str. 38, 44, 45) pokládám za poměrně neuspokojivé, protože neumožňují vidět výšku a tvar celkového píku. Z jakého důvodu nebylo možné sledovat celý jeho profil?
2. V práci rutinně používáte termín CaMKK2-S100, S511. Na straně 18 sice vysvětlujete, co tato zkratka znamená, ale bylo by možno ještě pro doplnění a ujasnění vysvětlit význam tohoto konstruktu a objasnit, které mutace obsahuje a proč?
3. Byla koncentrace lysozymu zmíněná na str. 23 skutečně 0.1 μ g/ml, nebo se jedná o překlep?

Závěrem bych chtěl vyjádřit, že přes drobné nedostatky považuji tuto práci za velmi kvalitní a doporučuji ji k další obhajobě.

V Praze 3. 6. 2019

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.