

Posudek oponenta na diplomovou práci:

Bc. Tomáš Kučera

obor Biochemie, PŘF UK v Praze

„Charakterizace signálních peptidas mitochondriálního typu“.

Diplomová práce Tomáše Kučery se zabývá studiem struktury a funkce hydrogenosomální (HPP) a mitochondriální (MPP) procesující peptidasy. Práce byla vypracována v Laboratoři sekundárních metabolitů MBÚ AV ČR, která se dané problematice dlouhodobě a úspěšně věnuje.

Hlavními cíly diplomové práce Tomáše Kučery bylo připravit obě podjednotky HPP, substrát pro měření aktivity HPP, nalézt podmínky pro optimální aktivitu HPP a dále prostudovat možné interakce mitochondriální a hydrogenosomální procesující peptidasy. Kromě biochemických studií se diplomant ještě zabýval dynamickými simulacemi s cílem prostudovat mechanismus rozpoznávání substrátů mitochondriální procesující peptidasou.

Tomáš Kučera úspěšně exprimoval a purifikoval jak substrát pro měření aktivity HPP, tak i obě podjednotky tohoto enzymu. Následně prostudoval vliv různých parametrů na aktivitu HPP a našel podmínky optimální aktivity. V rámci těchto experimentů zjistil, že aktivita HPP vyžaduje přítomnost obou podjednotek (tady α i β). Dále se diplomant pokusil pomocí dvouhybridového systému ověřit přímou interakci těchto podjednotek. Tyto experimenty však interakci mezi podjednotkami α a β HPP nepotvrdily. V další části své diplomové práce se Tomáš Kučera seznámil s metodami molekulové dynamiky proteinů a použil je ke studiu mechanismu interakcí mezi MPP a signální sekvencí jejich substrátů.

Předkládaná diplomová práce ukazuje, že autor získal řadu originálních poznatků a velmi dobře zvládl rozličné metody molekulární biologie (klonování a two-hybrid systém), proteinové biochemie (exprese, purifikace a refolding rekombinantních proteinů) a molekulové dynamiky. K formální podobě práce nemám žádné závažné připomínky, práce je napsána přehledně a pečlivě. V práci jsem našel pár překlepů a formulačních nejasností. Ty jsem však již s autorem prodiskutoval a jejich vliv na kvalitu předkládané práce je minimální. Diskuse získaných výsledků a citace použité literatury je adekvátní.

K předkládané diplomové práci mám jen několik drobných připomínek a otázek:

1. Jaký je rozdíl mezi elektrochemických a membránovým (elektrostatickým) potenciálem? Na straně 17 tento pojmem ne zcela korektně zmiňujete.
2. Jak si vysvětľujete, že během purifikace a ve vzorcích při měření aktivity jste interakci mezi podjednotkami HPP α a β pozoroval, ale výsledky experimentů s two-hybrid systémem ani gelová filtrace tyto interakce nepotvrdila?
3. Jaký byl celkový výtěžek přípravy jednotlivých podjednotek HPP a jaké byly koncentrace těchto proteinů ve vzorcích při měření aktivity.
4. Co je hnací silou vtahování signální sekvence do aktivního centra MPP?
5. Myslíte si, že metoda TMD (cílená molekulová dynamika) je optimální metodou studia molekulového rozpoznávání?

Závěrem konstatuji, že Tomáš Kučera ve své diplomové práci demonstroval schopnost samostatné vědecké činnosti a předložená práce více než splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě.



Doc. RNDr. Tomáš Obšil PhD.
Přírodovědecká fakulta UK
9. května 2008