

Posudek oponenta na bakalářskou práci

Eva Macáková

„Cílená mutagenese a exprese DNA-vazebné domény proteinu FOXO4“

Posuzovaná bakalářská práce obsahuje 31 stran textu. Textová část se skládá z 8 kapitol, v nichž autorka postupně pojednává o biochemickém pozadí FOXO forkhead transkripčních faktorů, 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 diskusi.

Bakalářská práce se zabývá přípravou dvou mutantních verzí DNA-vazebné domény forkhead transkripčního faktoru FOXO4. Protein FOXO4 je důležitý transkripční aktivátor a mechanismus jeho regulace je stále nejasný. Fosforylace určitých aminokyselin představuje jeden ze základních mechanismů regulace funkce FOXO proteinů. V předkládané práci se autorka zabývala přípravou mutací, které napodobují efekt fosforylace FOXO4 proteinu na serinu Ser149.

Dějová linka práce je následující:

- 1) Autorka metodou PCR provedla dvojí mutagenesi serinu Ser149 v sekvenci DNA-vazebné domény proteinu FOXO4. Jeden mutant obsahoval mutaci Ser149Asp, druhý Ser149Glu. Obě tyto mutace vnesou na pozici serinu 149 záporný náboj, což napodobuje efekt fosforylace.
- 2) Výsledek mutagenesní PCR reakce byl ověřen pomocí agarosové elektroforesy.
- 3) Po úspěšně provedené mutagenesi Eva Macáková provedla expresní test připravených mutantů a ukázala, že bakterie *E.coli* tyto proteiny 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 byla exprimována pouze DNA-vazebná doména proteinu FOXO4? Má to nějaké výhody?

Po prostudování diplomové práce Evy Macákové 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 nepochybně použity v dalším studiu mechanismu regulace FOXO4. Kvalita formálního zpracování práce je dobrá. V práci se sice vyskytuje pár neobratných formulací a překlepů, ale ty nijak nesnižují kvalitu práce. Domnívám se proto, že bakalářská práce Evy Macákové splňuje všechny předpoklady kladené na práci tohoto typu a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 9. 6. 2008

Ing. Jan Teisinger, CSc.
FGÚ AV ČR