

Posudek oponenta na diplomovou práci

Veroniky Klatovské

„Příprava a charakterizace N-terminálně zkrácené verze enzymu serotonin N-acetyltransferázy“

Posuzovaná diplomová práce obsahuje 55 stran textu. Textová část se skládá z 8 kapitol, v nichž autorka postupně pojednává o biochemickém pozadí studovaných proteinů (serotonin N-acetyltransferáza a 14-3-3 protein), cílech diplomové práce, použitých experimentálních metodách exprese a purifikace proteinů a nakonec provádí výčet dosažených výsledků a jejich diskuzi.

Diplomová práce se zabývá přípravou protokolu umožňujícího purifikaci miligramových množství aktivního enzymu serotonin N-acetyltransferázy (AANAT). Tento enzym je zodpovědný za cyklické změny koncentrace hormonu melatonin v krvi. Melatonin je hormon podílející se na regulaci celé řady fyziologických procesů (denní rytmus organismu, spánek, stárnutí apod.). Syntéza a uvolňování melatoninu v organismu jsou inhibovány světlem a stimulovány tmou. Na molekulární úrovni je aktivita enzymu AANAT regulována prostřednictvím fosforylace a interakce s proteinem 14-3-3.

Dějová linka diplomové práce je následující:

- 1) Autorka provedla expresi AANAT ve formě fuzního proteinu s glutathion S-transferázou pomocí bakteriálního expresního systému. Poté pomocí afinitní chromatografie na glutathion sepharose vypurifikovala fuzní protein.
- 2) Pomocí proteázy thrombinu rozštěpila fuzní protein GST-AANAT a uvolněnou glutathion S-transferázu částečně odstranila opět pomocí afinitní chromatografie na glutathion sepharose.
- 3) Částečně purifikovanou AANAT dále purifikovala pomocí gelové filtrace a získala tak velmi čistý protein.
- 4) Autorka dále provedla stanovení aktivity připraveného enzymu a ukázala, že aktivita je srovnatelná s kompletní verzí AANAT.
- 5) Na závěr autorka provedla fosforylaci části svého preparátu a ukázala, že fosforylovaná verze AANAT interaguje se 14-3-3 proteinem.

K předložené práci mám následující otázky:

- 1) Proč byla v druhé fázi purifikace použita gelová filtrace a ne např. iontově-výměnná chromatografie?
- 2) Proč byl ke stanovení enzymové aktivity použit tryptamin a ne serotonin, který je přirozeným substrátem enzymu?
- 3) Jak si vysvětlujete, že odstranění 32 aminokyselin z N-konce AANAT nemá vliv na aktivitu enzymu?

4) Myslíte, že je možné ještě více zvýšit výtěžek purifikace?

Po prostudování diplomové práce Veroniky Klatovské chci konstatovat, že jde o práci kvalitní, ve které autorka prokázala, že ovládá řadu experimentálních technik a dokáže je vhodně aplikovat. Práce vedla k získání originálních poznatků. Autorka navrhla protokol pro přípravu N-terminálně zkrácené verze serotonin N-acetyltransferázy a ukázala, že takto purifikovaný enzym je plně aktivní. Práce působí kompaktním dojmem, kvalita formálního zpracování je vysoká. V práci se sice vyskytuje pár neobratných formulací, ale ty nijak nesnižují kvalitu práce. Domnívám se proto, že diplomová práce Veroniky Klatovské splňuje všechny předpoklady kladené na práci tohoto typu a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 19. 5. 2006



Ing. Jan Teisinger, CSc.
FGÚ AV ČR