

Posudek školitele na diplomovou práci Veroniky Klatovské

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

Diplomová práce Veroniky Klatovské je součástí projektu zaměřeného na studium mechanismu regulace enzymu serotonin N-acetyltransferáza (AANAT). Tento enzym katalyzuje přenos acetylové skupiny z AcCoA na serotonin. Tato reakce je rychlost řídicí krok biosyntézy neurohormonu melatoninu. Aktivita AANAT vykazuje výrazný 24 hodinový rytmus, kdy aktivita enzymu značně vzrůstá v noci a zvyšuje tak koncentraci melatoninu v krvi o dva řády. Toto zvýšení aktivity je indukováno fosforylací AANAT na N- a C- koncích protein kinázou A. Samotná fosforylace na aktivitu enzymu vliv nemá a je to vazba regulačního 14-3-3 proteinu, která ovlivňuje strukturu aktivního centra enzymu a zvyšuje jeho aktivitu. První detaily o tomto systému byly získány vyřešením krystalové struktury 14-3-3 proteinu a C-terminálně zkrácené verze AANAT, která neobsahovala N-terminální PKA fosforylační místo. Tento komplex však neodpovídá skutečné biologické podobě komplexu, kterou se však dlouhodobě nedaří vykrytalizovat. Biochemické studie naznačují, že vazba 14-3-3 proteinu na C-terminální fosforylační místo může mít ještě větší vliv na aktivitu než vazba na N-terminální místo. Proto se chceme pokusit vykrytalizovat komplex 14-3-3 proteinu a N-terminálně zkrácené verze AANAT, která bude obsahovat pouze C-terminální fosforylační místo a N-terminální fosforylační místo bude odstraněno.

Hlavním cílem diplomové práce Veroniky Klatovské bylo provést expresi a navrhnout protokol purifikace N-terminálně zkrácené verze AANAT, který by umožňoval přípravu miligramových množství aktivního enzymu. Veronika Klatovská se tohoto úkolu úspěšně zhostila. V rámci své diplomové práce ustanovila purifikační protokol pomocí kterého připravila přibližně 3 mg velmi čistého enzymu ze 4 litrů bakteriální kultury. Purifikace této verze AANAT není jednoduchá, protože v porovnání s C-terminálně zkrácenou verzí je expresní výtěžek výrazně nižší a protein má větší tendenci agregovat. Veronika Klatovská dále stanovila enzymovou aktivitu purifikovaného enzymu a ukázala, že naměřené hodnoty K_M a k_{cat} pro substrát tryptamin jsou srovnatelné s hodnotami publikovanými pro celý enzym. V další etapě Veronika Klatovská provedla fosforylací enzymu a pomocí nativní

elektroforézy a gelové filtrace získala předběžné výsledky ukazující, že fosforylovaná N-terminálně zkrácené verze AANAT interaguje se 14-3-3 proteinem.

Diplomová práce Veroniky Klatovské představuje významný pokrok v naší práci na přípravě komplexu 14-3-3 proteinu s fosforylovanou N-terminálně zkrácenou verzí AANAT, který bude dále charakterizován.

Veronika Klatovská na svém projektu pracovala s velkým zájmem a s velkou trpělivostí překonávala počáteční nezdary. Rychle a dokonale zvládla celé spektrum metod molekulární biologie a proteinové biochemie (práce s plasmidovou DNA, cílená mutageneze, exprese a purifikace proteinů, stanovení enzymové aktivity). Ukázala, že dokáže pracovat velmi pečlivě a samostatně.

Myslím si proto, že diplomová práce Veronika Klatovské splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě.

V Praze dne 18.5. 2006



RNDr. Tomáš Obšil PhD.