Posudek školitele na diplomovou práci Elišky Nedbálkové

„Příprava komplexů 14-3-3 proteinu a tryptofanových mutantů regulační domény tyrozin hydroxylázy".

Diplomová práce Elišky Nedbálkové je součástí projektu zaměřeného na studium mechanizmu regulace enzymu tyrozin hydroxylázy (TH) prostřednictvím vazby 14-3-3 proteinu. Tyrozin hydroxyláza katalyzuje hydroxylaci aminokyseliny tyrozin za vzniku L-3,4-dihydroxyfenylalaninu. Tato reakce je první a rychlost určující krok biosyntézy katecholaminových neuropřenášečů dopaminu, norepinefrinu a epinefrinu. Disfunkce TH se podílí na vzniku depresí nebo Parkinsonovy choroby. Proto je studiu regulace funkce tohoto důležitého enzymu věnována značná pozornost. Tyrozin hydroxyláza je regulována prostřednictvím fosforylace na své regulační doméně, kde dochází k fosforylaci dvou serinových zbytků – Ser19 a Ser40. Pro zvýšení aktivity TH je důležitá fosforylace Ser40, zatímco fosforylace Ser19 indukuje vazbu regulačního 14-3-3 proteinu. Úloha vazby 14-3-3 proteinu v mechanizmu regulace TH je však stále nejasná. Proto jsme se rozhodli studovat vliv vazby 14-3-3 proteinu na strukturu regulační domény TH.

Hlavním cílem diplomové práce Elišky Nedbálkové bylo pomocí cílené mutageneze připravit 5 mutantů regulační domény TH obsahující pouze jeden tryptofanový zbytek na předem vybraných místech. Po úspěšném zvládnutí této části projektu provedla Eliška Nedbálková expresi a purifikaci několika rekombinantních proteinů. Jednak purifikovala původní nemutovatou verzi regulační domény TH, dále dva připravené mutanty regulační domény TH a dvě různé varianty 14-3-3 proteinu. Všechny zmíněné proteiny se Elišce Nedbálkové podařilo úspěšně připravit. V další etapě provedla fosforylaci vzorků TH a pomocí nativní elektroforézy ukázala, že obě mutantní verze regulační domény TH interagují se 14-3-3 proteinem stejně tak jako WT.

Diplomová práce Elišky Nedbálkové představuje významný pokrok v naší práci na přípravě komplexů 14-3-3 proteinu s regulační doménou TH, které budou vhodné pro dynamická fluorescenční měření a pro studium vlivu fosforylace a vazby 14-3-3 proteinu na konformaci TH.

Eliška Nedbálková se během práce na své diplomové práci stala nedílnou součástí naší laboratoře a na svém projektu pracovala s velkým zájmem a trpělivostí.

Rychle a dokonale zvládla celé spektrum metod molekulární biologie a proteinové biochemie (práce s plasmidovou DNA, cílená mutageneze, exprese a purifikace proteinů). Ukázala, že dokáže pracovat velmi pečlivě a samostatně. Kromě práce na své diplomové práci se aktivně účastnila i řešení dalších projektů naší skupiny.

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

V Praze dne 18.5. 2006

RNDr. Tomáš Obšil PhD.