

Oponentský posudek diplomové práce Darji Koutové/Blokešové „Charakterizace vazebného místa pro peptid CART“

Diplomová práce Darji Koutové se zabývá studiem neuropeptidu CART, který je posledních několik let studován zejména kvůli svým anorexigenním účinkům jako potenciální prostředek proti obezitě. Ve své diplomové práci vycházela z předchozích studií školitelské laboratoře, včetně dobře zavedeného kompetitivního vazebného testu k diferencovaným i nediferencovaným buňkám PC12 s použitím radioaktivně značeného peptidového ligandu. Kolegyni Koutové se podařilo připravit fluorescenční a biotinylovaný fragment peptidu CART (aminokyseliny 61-102) a prokázat, že se takto modifikované peptidové fragmenty vážou k cílovým buňkám s podobnou nebo maximálně o řád nižší afinitou, než peptidy neznačené. Radioaktivně značený fragment peptidu CART pak použila k hledání přirozeného receptoru peptidu CART na membránách buněk PC12 zesíťováním příslušného komplexu receptor-ligand pomocí čtyř různých činidel, přičemž zachytila potenciální vazebný protein o velikosti 35 kDa.

Práce má 71 stran a 98 odkazů na literaturu. Z metodického hlediska obsahuje zejména modifikace peptidů, práce s tkáňovými kulturami, měření afinity ligandu a receptoru pomocí radioaktivního značení a síťování komplexů protein-ligand. Diplomantka získala některé výsledky, které byly uveřejněny ve dvou publikacích, jejichž je spoluautorkou, a které mohou přispět k hlavnímu cíli projektu – identifikaci receptoru nebo receptorů pro peptid CART.

K práci mám několik formálních i věcných připomínek.

Formální připomínky:

1/ názvy enzymů se neřídí pravidly vydávanými Ústavem pro jazyk český, ale chemickými nomenklaturními pravidly. Enzymy se správně píší „proteasa, konvertasa“, aminokyselina je „isoleucin“ (viz strana 7, 8 a jinde)

2/ Autorka má obvyklé a pravděpodobně nevyhnutelné problémy s anglicismy (např. „Reflex IV hmotnostní spektrometr“ není česky, správně má být „hmotnostní spektrometr Reflex IV“). K tomu se ještě přidává latinská anatomická, zčásti počestěná nomenklatura, což občas vede k obtížné srozumitelnosti textu. Autorka se měla pokusit v Úvodu některé méně běžné anatomické termíny lépe vysvětlit.

3/ Seznam zkratk není zpracován pečlivě. Chemickým sloučeninám chybí správné názvy (APS), některé zkratky jsou uvedeny jen anglicky nebo latinsky, jiné přeloženy.

4/ zajímavý a užitečný výklad o síťovacích činidlech na straně 36 nepatří do metodické části, ale do Úvodu, stejně jako výklad o kinasách na straně 41.

Věcné připomínky a dotazy k diskusi:

1/ jaký je mechanismus účinku „prohormon konvertasy PC 1/3“, co je o tomto enzymu známo?

2/ Ví se něco o mechanismu, jakým peptidy CART zesilují aktivaci NMDA receptorů glutamátem?

3/ Pokusila se autorka využít biotinylovaného peptidu CART k přímé izolaci interagujících proteinů z buněčných kultur pomocí afinitní chromatografie?

4/ Pokud jsou k dispozici monoklonální protilátky proti CART, jsou známy v literatuře nějaké výsledky naznačující kolokalisaci CART s určitými receptory (fluorescenční mikroskopie, koimunoprecipitace?)

Závěrem konstatuji, že uvedené formální připomínky nijak nesnižují úroveň této diplomové práce, kterou plně doporučuji k obhajobě na katedře biochemie PřF UK.

V Praze, 20.5. 2009

Jan Konvalinka

