

POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Předložená diplomová práce studentky Pavly Strnadové nazvaná „**Využití lanthanoidové luminiscenční spektroskopie ke studiu vazby dvojmocných kationů na 14-3-3 proteiny**“ se zabývá významným a doposud nepříliš probádaným problémem specifické vazby dvojmocných biogenních kationů na strukturální motiv EF-ohybu tří různých izoform regulčního proteinu 14-3-3. Jelikož lze očekávat, že vazba dvojmocných iontů indukuje výrazné konformační změny proteinové struktury, a následně moduluje afinitu 14-3-3 k jeho vazebným partnerům, má prokázání této specifické vazby a její charakterizace hlubší význam pro pochopení buněčných regulačních procesů.

Mezi hlavní cíle práce patřila exprimace a purifikace vybraných izoform 14-3-3 proteinu, vypracování metodiky pro studium vazby dvojmocných kationů pomocí fluorescence Tb^{3+} a v neposlední řadě též použití této metody pro charakterizaci vazby Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} na 14-3-3 protein. Následně byly učiněny předběžné pokusy prokázat konformační změny proteinu provázející vazbu zmíněných iontů. K tomuto účelu byla využita emise fluorescenční sondy ANS, která svým kvantovým výtěžkem fluorescence citlivě odráží změny hydrofobicity hydratovaného proteinového povrchu.

K dosažení cílů diplomátka musela zvládnout nejen řadu metodik pro purifikaci a biochemickou charakterizaci proteinů, ale i elegantní metodu lanthanoidové fluorescence napájené rezonančním přenosem energie z aromatických aminokyselin. Diplomantce se podařilo proteiny izolovat, charakterizovat a určit vazebné konstanty Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} pro tři izoformy 14-3-3 proteinu. Specifita vazby byla prokázána kompetičními experimenty. U jedné z izoform byly zaznamenány konformační změny provázející vazbu dvojmocných iontů. Vytyčených cílů práce tedy bylo beze zbytku dosaženo.

Diplomová práce Pavly Strnadové je formálně i jazykově na dobré úrovni s dobrou proporcí mezi teoretickou a výsledkovou částí, kdy výsledky a jejich diskuse zabírají přibližně třetinu z celkového počtu 68 stran. Citované prameny jsou dostatečné a relevantní. Z formálního hlediska lze vytknout jen pár nevýznamných překlepů a hůře čitelné legendy u některých obrázků v úvodní části práce.

K práci mám následující komentáře a upřesňující dotazy:

- 1) Není zcela jasně vysvětleno proč není detekována fluorescence volného Tb^{3+} v roztoku.
- 2) Pro laika není explicitně vysvětleno, co znamená symbol x v rovnici 4.1. na str. 51.
- 3) Je známo, že protein 14-3-3 se může vyskytovat ve formě homodimeru nebo heterodimeru. Heterodimer nebo fosforylace pouze jednoho monomeru vytváří předpoklady pro existenci neekvivalentních vazebných míst. Byla uvažována možnost vyhodnotit vazebné izotermy na str. 52-53 pomocí heterogenního modelu pro vazbu do dvou vazebných míst? Data na str. 53 by tuto možnost mohla naznačovat.

Závěrem. Předložená práce Pavly Strnadové je kvalitní a zcela splňuje požadavky kladené na diplomovou práci. Studentka prokázala schopnost vědecky pracovat a prezentovat dosažené výsledky. Proto navrhuji tuto práci uzнат jako práci diplomovou a hodnotit známkou výborně.

V Praze dne 15.5.2008



Doc. RNDr. Petr Heřman, CSc.