

Posudek školitele na diplomovou práci Pavly Strnadové

„Využití lanthanoidové luminiscenční spektroskopie ke studiu vazby dvojmocných kationtů na 14-3-3 proteiny“

Diplomová práce Pavly Strnadové je součástí projektu zaměřeného na studium mechanismu regulace vazebných vlastností jednotlivých isoform 14-3-3 proteinů. Jedním z faktorů, které by mohly ovlivňovat vazebné vlastnosti isoform 14-3-3 proteinů je vazba dvojmocných kationtů. Vazba iontů Mg^{2+} a Ca^{2+} a její vliv na vazebné vlastnosti 14-3-3 proteinů je téma, kterému byla zatím věnována pouze minimální pozornost. Detailnější studie byla zatím provedena pouze pro jednu rostlinnou isoformu. Současné strukturní studie komplexu 14-3-3 s rostlinnou H^+ -ATPasou však naznačují, že právě vazba dvojmocných kationtů může být velmi důležitým stabilizujícím prvkem.

Proto jsem se rozhodli této problematice věnovat v diplomové práci Pavly Strnadové, jejímž hlavním cílem bylo zjistit, jestli i jiné isoformy 14-3-3 proteinů jsou schopny vázat dvojmocné kationty. Ke studiu byly vybrány tři různé isoformy: ječmenná 14-3-3A, lidská 14-3-3 ζ a kvasničná isoforma BMH2. Prvním úkolem Pavly Strnadové bylo provést expresi a purifikaci těchto isoform, což bez jakýchkoli problémů zvládla a získala dostatečné množství čistých proteinů. Poté následovalo studium vazby dvojmocných kationtů na tyto proteiny. Pro tento účel byla použita metoda založená na sledování změn luminiscence lanthanoidů (Tb^{3+} iontů) navázaných na studované proteiny. Pavla Strnadová nejdříve studovala vazbu samotných kationtů Tb^{3+} na jednotlivé isoformy 14-3-3 proteinů a následně metodou vytěšňování měřila vazbu kationtů Mg^{2+} , Ca^{2+} a Mn^{2+} . Také se pokusila sledovat možné konformační změny vyvolané vazbou dvojmocných kationtů pomocí sondy bis-ANS.

Výsledky práce Pavly Strnadové ukázaly, že všechny tři připravené 14-3-3 isoformy váží ionty terbia, přičemž rostlinná isoforma 14-3-3A s nejvyšší afinitou. Následující vytěšňovací experimenty ukázaly, že všechny tři studované isoformy jsou schopny vázat ionty Mg^{2+} , Ca^{2+} a Mn^{2+} , i když s nepříliš velkou afinitou (v mM oblasti). Tyto výsledky jsou prvním experimentálním důkazem, že i isoformy jiného než rostlinného původu mohou vázat

dvojmočné kationty. Toto je však pouhý začátek na cestě objasňování role dvojmočných kationtů v regulaci funkce 14-3-3 proteinů. V poslední části své práce Pavla Strnadová pomocí sondy bis-ANS zjistila, že vazba dvojmočných kationtů na rostlinnou isoformu 14-3-3A indukuje konformační změnu.

Pavla Strnadová se během práce na své diplomové práci stal nedílnou částí naší laboratoře a na svém projektu pracovala s velkým zájmem a pílí. Rychle a dokonale zvládla metody exprese rekombinantních proteinů v bakteriálním expresním systému, purifikace proteinů a metody fluorescenční spektroskopie. Ukázala, že dokáže pracovat velmi pečlivě a samostatně.

Myslím si proto, že diplomová práce Pavly Strnadové splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě. Dále doporučuji klasifikovat tuto diplomovou práci známkou 1.



V Praze dne 15.5. 2008

Doc. RNDr. Tomáš Obšil PhD.