

Mgr. Lenka Gryčová PhD.
Fyziologický ústav AVČR
Václavská 1083
142 20 Praha 4

Věc: Oponentský posudek diplomové práce

Téma: Studium strukturních rozdílů mezi isoformami 14-3-3 proteinů

Autor práce: Bc. Eva Macáková

Bc. Eva Macáková v přehledném teoretickém úvodu své diplomové práce prokázala, že se v dané problematice orientuje a na základě prostudované dostupné literatury ozřejmila dosud známé poznatky o jednotlivých isoformách 14-3-3 proteinů a jejich vazebných partnerech a to především ze strukturně funkčního hlediska. Vlastní práci zaměřila na studium vlastností oblasti ohybu mezi osmým a devátým alfa helixem ječmenné isoformy hv 14-3-3 A WT a s mutací G216S dále pak lidské isoformy 14-3-3 ζ WT a s mutací S207G

Použité metody kombinují standardní molekulárně-biologické postupy (transformace kompetentních buněk, izolace plasmidové DNA, heterologní exprese a více kroková purifikace proteinu) s biofyzikálními (měření emisních a excitačních spekter, fluorescenční korelační spektroskopie, stacionární měření intenzity fluorescence užitá pro charakterizaci vazby peptidů).

Výsledky práce přispěly k lepšímu prozkoumání vlivu ohybu mezi osmým a devátým helixem dvou izoform 14-3-3 proteinu na jeho vazebné vlastnosti. Výsledky jednotlivých kroků purifikačního protokolu zobrazené pomocí SDS-PAGE potvrzují kvalitu použitých vzorků pro vlastní stanovování vazebné afinity. Disociační konstanty byly určeny dvěma různými metodami a bylo dosaženo konzistentních výsledků, které autorka zařadila do souvislosti s již dříve publikovanými poznatky.

Po formální stránce je práce přehledně a pěkně graficky upravena, s dostatečným rozsahem (64 stran) a množstvím použité literatury (64 citací). Předkládaná diplomová práce ukazuje, že autorka získala řadu cenných poznatků a velmi dobře zvládla rozličné metody purifikace proteinů a fluorescenční spektrometrie.

Mám jen drobnou poznámku k použitému jazyku. V textu jsem několikrát zaregistrovala slangové výrazy či anglikanismy (fitovat a podob.). Tyto termíny jsou sice v běžné praxi užívané, nicméně by stálo za zvážení zda je vhodné jejich užívání v psaném formálním projevu.

Během obhajoby bych ráda vznesla tyto dotazy.

1. Jaký byl původ peptidů pRaf-259 a jak bylo provedeno jejich značení fluorescenčními sondami a jejich fosforylace. Ověřovala jste si zda je peptid fosforylovaný? Tyto údaje jsem v metodické části postrádala
2. Zmiňuje, že vazebné vlastnosti 14-3-3 proteinů jsou regulovány posttranslačními modifikacemi, zejména fosforylací a vazbou kofaktorů. V této práci byly použity pro stanovování vazebné afinity protein exprimovaný v *E. coli*, což je expresní systém, který tyto modifikace nezaručuje. Jakými metodami jste ověřili popř. jak jste zaručili, že naměřené hodnoty jsou skutečně fyziologické a nejsou zatíženy chybějící přítomností kofaktoru či fosforylace?
3. Zmiňujete přítomnost „EF hand like“ motivu na ohybu H8-H9 a popisujete jej jako „helix otáčka helix“, který je u tohoto ohybu „otočený“? Co tím bylo míněno? Vysvětlete, prosím. Ohyb H8-H9 váže ionty kovu, je v této vazbě zainteresovaný i EF

hand like motive? Dochází v souvislosti s vazbou k nějakým významnějším konformačním změnám? Domníváte se, že by tyto případné konformační změny mohlo mít souvislost se změnami afinity k některým vazebným partnerům?

4. Jedna z použitých metod pro stanovení vazebné afinity bylo stacionární měření intenzity. Jaký se domníváte, že je důvod snižování intenzity FITC při vazbě na protein. Nemůže jít například pouze o artefakt například v důsledku ředění sondy, či jejím vybělování? Byly provedeny korekce na ředění sondy u naměřených dat?

Závěrem konstatuji, že Bc. Eva Macáková ve své diplomové práci jasně demonstrovala schopnost samostatné vědecké činnosti a předložená práce splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci a doporučuji ji přijmout k obhajobě.