

KATEDRA FYZIKÁLNÍ A MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE PŘF UK V PRAZE

doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Tel. 221951303

E-mail: obsil@natur.cuni.cz

Posudek školitele na diplomovou práci Evy Macákové

„Studium strukturních rozdílů mezi isoformami 14-3-3 proteinů“

Diplomová práce Evy Macákové je součástí projektu zaměřeného na studium mechanismu regulace vazebných vlastností jednotlivých isoform 14-3-3 proteinů a tematicky navazuje na diplomovou práci Mgr. Lucie Kohoutové, která byla obhájena v roce 2008 na katedře biochemie PŘF UK. Proteiny 14-3-3 specificky interagují s jinými proteiny, které obsahují specifický fosforylovaný vazebný motiv. Strukturní studie ukázaly, že vazebné místo, kde dochází k vazbě motivu je obklopeno z obou stran flexibilními ohyby. Jeden z těchto ohybů, tzv. H8-H9 ohyb, se přímo podílí na vazbě ligandů. Předchozí experimenty ukázaly, že změny sekvence H8-H9 ohybu mají určitý vliv na vazebné vlastnosti některých isoform proteinů 14-3-3. Cílem práce Evy Macákové bylo porovnat vazebnou afinitu některých lidských a rostlinných isoform proteinu 14-3-3 a zejména vliv určité mutace v H8-H9 ohybu na tuto vazebnou afinitu. Interakce proteinů 14-3-3 se syntetickým fluorescenčně označeným fosforylovaným peptidem byla sledována pomocí dvou různých fluorescenčních technik. První metoda byla založena na zhášení stacionární fluorescence fluoroforu a druhou metodou byla fluorescenční korelační spektroskopie (FCS experimenty byly realizovány ve spolupráci se skupinou prof. M. Hofa z UFCH JH AV ČR). Práce Evy Macákové ukázala, že jak v případě lidských, tak i ječmenných isoform proteinu 14-3-3 dochází po mutaci H8-H9 ohybu ke snížení vazebné afinity. Tento zajímavý výsledek je v rozporu s výsledky publikovanými v literatuře. Proč tomu tak je zatím nedokážeme vysvětlit. Proto se studiu vlivu struktury H8-H9 ohybu na vazebné vlastnosti isoform proteinů 14-3-3 budeme dále věnovat.

Eva Macáková se během práce na své diplomové práci stala nedílnou částí naší laboratoře a na svém projektu pracovala s velkým zájmem a entusiasmem. Časově náročné a velmi pracné vazebné titrace prováděla s velkým nasazením. Rychle zvládla řadu metod molekulární biologie, exprese rekombinantních proteinů v bakteriálním expresním systému,

purifikace proteinů a metod fluorescenční spektroskopie. Ukázala, že dokáže pracovat pečlivě a samostatně.

Myslím si proto, že diplomová práce Evy Macákové naprosto 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 20.5. 2010

doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.