



Doc. RNDr. Karel Bezouška CSc.

Katedra biochemie

Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta

Hlavova 8

12840 Praha 2

Tel. +2-2195-1272 Fax.+2-2195-2331

E-mail: bezouska@biomed.cas.cz

Posudek oponenta na diplomovou práci Jitky Zájedové “Receptor smrti DR6: interagující proteiny a expresní analýza”

Ve své diplomové práci se Jitka Zájedová zabývala hledáním proteinů interagujících s intracelulární částí receptoru buněčné smrti DR6, jejich funkčním významem v savčích buňkách, a analyzovala též podmínky transkripce tohoto genu a zabývala se studiem jeho promotoru. Programovaná buněčná smrt a signály vedoucí k její propagaci nebo naopak potlačení patří mezi horká, a velmi módních témata současného biomedicínského výzkumu. Právem, neboť kromě poznání základních mechanismů buněčné diferenciaci a smrti umožňují nalézat nové látky fungující jako modulátory těchto procesů, z nichž se dnes rychle stávají moderní léčiva bránící předčasnému odumření normálních buněk a sloužících k eliminaci buněk poškozených nebo nádorově transformovaných.

Z práce je na první pohled vysoké experimentální nasazení kandidátky, což spolu s vynikajícím pracovním prostředím laboratoře Dr. Anděry jistě přispělo ke kvalitě získaných výsledků. Důležité je zmínit alespoň identifikaci 6 proteinů interagujících s intracelulární částí receptoru buněčné smrti DR6, z nichž se potom diplomantka dvěma zabývala detailněji a studovala je i u savčích buněčných linií, u nichž se podařilo dosáhnout nadprodukce těchto proteinů. Byla sledována zejména interakce s DR6 metodou koimunoprecipitace, a dále kolokalizace pomocí buněčných technik a konfokální mikroskopie. Celkový molekulární obraz DR6 proteinu byl ještě doplněn detailní analýzou promotorových sekvencí genu pro tento protein a specifických regulátorů jeho exprese.

Získané výsledky zpracovala diplomantka do předkládané práce, která má rozsah 83 stran, a obsahuje 20 obrázků, 9 tabulek a 89 literárních odkazů. Úvod práce zahrnující informačně bohatou problematiku ligandů a receptorů buněčné smrti a způsoby jejich signalizace je zpracován za pomoci pěkných obrázků velmi přehledně. Metodika práce je přehledná a vyčerpávající, umožňuje reprodukovat provedené výsledky. Poněkud rušivý je pouze odkaz (str.33) na komerční návod typu experiment byl prováděn dle návodu umístěného v soupravě, který má pro čtenáře téměř nulovou informační hodnotu: lépe by bylo uvést hned za návodem odkaz na odpovídající internetové stránky s příslušným protokolem. Výsledky experimentů jsou popsány přesně, a podrobně diskutovány včetně návrhů na případné další experimenty.

Po formální stránce je práce na vynikající úrovni, téměř neobsahuje žádné nejasnosti ani překlepy. Je evidentní, že přípravě práce byla věnována maximální pozornost i dostatek času. K celé práci mám proto z tohoto hlediska jen naprosté minimum připomínek, které dále pro potřeby autorky uvádím. Látka o vzorci CNBr se nenazývá určitě bronidokyanatan, ale bromkyan nebo kyanobromid. Na str. 12 je sdělení, že cytoplasmatický protein je přítomný v endosomech, které by si asi zasloužilo detailnější komentář, neboť standardně se proteiny dostávají buď do cytoplasmy nebo do endosomů, a to za dosti odlišných podmínek. Formulaci cysteinové můstky na str. 16 považuji za dosti neobvyklou, navíc chemicky nesprávnou: označení cystein je vyhrazeno pro redukovanou formu této aminokyseliny, takže můstek by mohl maximálně být cystinový, spíše však

disulfidový. U seznamu používaných protilátek na str. 30 je uveden původ pouze některých z nich. Na str. 34 i jinde v práci se dovoláváte kapitol 1.25, 1:42 apod., které však v práci neexistují. Seznam literatury je zřejmě tvořen anglickým reference managerem, ale označení p. pro stránkový rozsah jste měla v česky psané práci vynechat.

Ke kandidátce a její práci mám následující dotazy:

1. V literárním úvodu (obr. 1) mne zaujal sekretovaný protein nesoucí tzv. smrtící doménu. Má tato doména nějaký funkční význam u extracelulárních proteinů?
2. Uvádíte, že bakteriální protein obsahující histidinovou kotvu jste po analýze na SDS elektroforese použila pro imunizaci králíků. Můžete vysvětlit, v jaké podobě přesně se pro tento účel protein použil ?
3. U popisu výsledků na str.55 a str. 60 se uvádí, že produkované proteiny jsou označeny hvězdičkou. Znamená to, že ostatní proteiny, které nejsou hvězdičkou označeny, produkovány nebyly?
4. Z kolokalizačních výsledků na obr.13 se zdá, že zatímco samotný DR6 je lokalizovaný jednak na buněčném povrchu a jednak v endosomech, nachází se SNX3 pouze v endosomech. Je možné, že interaguje s DR6 pouze v průběhu jeho biosyntézy nebo naopak degradace, a na buněčný povrch se nedostává?
5. Zaujal mne Váš názor, že výsledky získané v kvasinkových buňkách je potřebné ověřit též v "přirozenějším" prostředí buněk savčích. Jestliže ovšem vyvoláme dle Vaší strategie v savčích buňkách nepřirozeně vysokou nadprodukcí hned dvou proteinů, abychom je mohli dobře studovat, jedná se opravdu ještě o "přirozené" podmínky. Zajímá mne Váš názor, protože metodika nadprodukce studovaných proteinů v savčích buňkách je v molekulární biologii hojně používána.

Závěrem bych rád zdůraznil, že předkládaná diplomová práce jak po stránce experimentálního vypracování tak i po stránce formální nejen splňuje, ale i daleko překračuje požadavky kladené na diplomové práce na katedře biochemie PŘFUK. Rád proto doporučuji práci k obhajobě, a přeji kandidátce mnoho štěstí v jejím dalším experimentálním snažení.

V Praze dne 16.5.2006

Doc. RNDr. Karel Bezouška CSc.