

Posudek školitele na bakalářskou práci Evy Macákové

„Cílená mutagenese a exprese DNA-vazebné domény proteinu FOXO4“

Bakalářská práce Evy Macákové je součástí projektu zaměřeného na studium mechanismu regulace forkhead transkripčního faktoru FOXO4. Transkripční faktory FOXO hrají klíčovou roli v řadě biologicky významných dějů jako je např. regulace apoptosy, odpověď na oxidativní stres, regulace metabolismu atd. Přestože se jedná o velmi významnou skupinu transkripčních faktorů, přesný mechanismus jejich regulace je stále nejasný. Transkripční aktivita FOXO faktorů je řízena skrze fosforylaci proteinkinasou B. Tato fosforylace má za následek inhibici vazby DNA, vazbu regulačního 14-3-3 proteinu a rychlý export komplexu z jádra do cytoplasmy. Výsledky získané v posledních letech naznačují, že kromě tohoto mechanismu jsou FOXO proteiny ještě fosforylovány jinými kinasami či acetylovány acetylasami na řadě dalších míst. Jedním z hlavních cílů našeho výzkumu je objasnit molekulární mechanismy těchto dějů.

Hlavním cílem bakalářské práce Evy Macákové bylo pomocí cílené mutagenese metodou PCR připravit 2 mutantní formy DNA-vazebné domény forkhead transkripčního faktoru FOXO4 obsahující na pozici serinu 149 buď Asp nebo Glu. Tyto mutace vnesou na pozici 149 záporný náboj a napodobí tak fosforylaci Ser149 kinasou MST1. Po úspěšném zvládnutí této části projektu Eva Macáková ověřila pomocí expresního testu a SDS-PAGE elektroforézy expresi připravených mutantů FOXO4 proteinu v bakteriích *E. coli*.

Bakalářská práce Evy Macákové představuje důležitý krok v naší práci na mechanismu regulace funkce forkhead transkripčního faktoru FOXO4. Připravené mutanty se již používají pro studium vlivu fosforylace FOXO4 na jeho DNA-vazebné vlastnosti.

Eva Macáková se během práce na své bakalářské práci stala součástí naší laboratoře a na svém projektu pracovala s velkým zájmem a trpělivostí. Rychle a dokonale zvládla celé spektrum metod molekulární biologie a proteinové biochemie (práce s plasmidovou DNA, cílená mutagenese, exprese proteinů, SDS-PAGE). Ukázala, že dokáže pracovat velmi pečlivě a samostatně.

Myslím si proto, že bakalářská práce Evy Macákové splňuje všechny požadavky kladené na bakalářskou práci a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě.



V Praze dne 9.6. 2008

Doc. RNDr. Tomáš Obšil, PhD.