

Oponentský posudek diplomové práce

Helena Jindrová: Charakterisace proteinu Naaladase L2

Úkolem diplomové práce Heleny Jindrové bylo využít eukaryotický expresní systém k expresi proteinových konstruktů zahrnujících extracelulární a intracelulární části proteinu Naaladase L2 (N-acetylated α -linked acidic dipeptidase like 2 protein). Dále bylo jejím úkolem tyto proteinové konstrukty purifikovat, pokusit se tento protein charakterizovat z hlediska jeho možné proteasové aktivity a otestovat jeho interakci s potencionálními intracelulárními vazebnými partnery. Protein Naaladase L2 je transmembránový protein, vyskytující se za normálních podmínek na povrchu buněk ledvin a žaludku. V případě patologických stavů byla jeho exprese identifikována na řadě dalších míst; zvláště významná je skutečnost, že jeho zvýšená exprese se objevuje u pacientů s vyšším Gleasonovým skóre a znamená tedy horší prognózu budoucího vývoje. To dělá z tohoto proteinu nesmírně zajímavý cíl biomedicínského výzkumu. Naaladase 2 je blízce příbuzná s několika dalšími proteiny, z nichž nejprostudovanějším je molekula GCPII, jejíž výzkum má na pracovišti, na kterém vznikla tato diplomová práce již delší a úspěšnou tradici.

Práce má 81 stran, 20 obrázků, obsahuje 1 tabulku a je členěna klasickým způsobem. Je celá psána v dobré angličtině a obsahuje jen malé množství překlepů a chyb. V úvodu autorka seznamuje čtenáře s proteiny Naaladase L2, GCPII a jejich homology. Dále se poměrně podrobně zabývá různými metodami používanými pro výzkum protein-proteinových interakcí. Následuje vytyčení cílů diplomové práce, metodická část s podrobným popisem použitých technik a pracovních postupů, část představující získané výsledky a jejich diskuse. Práci zakončuje krátké shrnutí získaných výsledků a seznam citované literatury.

Vzhledem k tomu, že je tento protein ze svého strukturního a funkčního hlediska doposud velmi málo prostudován, jednalo se o velice zajímavý, do jisté míry pilotní projekt. Jeden z hlavních přínosů této práce představuje zavedení a optimalizace metod, které umožňují přípravu dostatečného množství tohoto proteinu k dalšímu výzkumu. Přesto, že je protein příbuzný svému mnohem lépe prostudovanému homologu, peptidáze GCPII, z výsledků této diplomové práce je zřejmé, že z funkčního hlediska se v případě Naaladasy L2 nejspíše vůbec nejedná o proteasu a funkce tohoto proteinu tak zůstává dosud neznámá. Pozoruhodným rysem molekuly Naaladase L2 je také heterogenita proteinového vzorku, jejíž příčina byla v této diplomové práci studovaná bez nalezení jednoznačného vysvětlení. Velice hodnotným přínosem práce je i první pokus o bližší identifikaci vazebných partnerů intracelulární části proteinu, který ukázal na několik proteinů podílejících se na organizaci cytoskeletu a regulaci buněčného cyklu. Jakkoliv předběžné tyto výsledky jsou, je nutno brát je v dalším výzkumu velice vážně. Doufejme, že se tato práce stane počátkem větší studie Naaladasy L2, která objasní blíže jak strukturu, tak funkci tohoto zajímavého proteinu.

K práci mám několik drobných kritických poznámek:

- 1) Úvodní část obsahuje velice podrobný výklad věnující se různým metodám výzkumu protein-proteinových interakcí, z nichž ovšem naprostá většina pak ve vlastní práci použita není. Jsem si samozřejmě vědom toho, že znalost těchto metod bude nezbytná ve stádiu výzkumu, ke kterému tato diplomová práce bezprostředně směřuje, nicméně má-li

být úvod opravdu úvodem, měl by podle mého názoru probírat spíše témata vztahující se k vlastní diplomové práci.

- 2) Některé obrázky by si zasloužily před vložením do diplomové práce přece jen větší péči (např. obr. 12, 13 aj.).
- 3) Pro správné pochopení vztahu Naaladase L2 k ostatním příbuzným proteinům by možná bylo vhodné obohatit srovnání sekvencí na straně 15 také o další homology tohoto proteinu, které jsou v textu jenom slovně zmíněny.

K práci mám tyto dotazy:

1. Máte nějakou hypotézu vysvětlující již zmíněnou heterogenitu proteinového vzorku Naaladase L2? Mohla by být příčinou např. vícenásobná fosforylace?
2. Proteinový konstrukt AviEXSTL2 obsahuje kromě extracelulární části proteinu i celou transmembránovou doménu. Má to nějaký význam? Není na místě obava, že to sníží stabilitu konstruktů?
3. Bylo možno zakoncentrovat preparát konstruktů AviEXSTL na vyšší koncentraci a pokusil se již někdo o krystalizaci tohoto proteinu?

Přes uvedené drobné komentáře považuji tuto práci za velice kvalitní a bylo pro mě velmi zajímavé a poučné si ji prostudovat. Podle mého mínění splňuje všechny podmínky, které jsou na ni kladeny. Doporučuji proto přijmout ji k další obhajobě.

V Praze 18. 5. 2015

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.