

Oponentský posudek diplomové práce

Olivia Petrvalská : Příprava a charakterizace katalytické domény lidské proteinkinasy ASK1

Úkolem diplomové práce Olivie Petrvalské bylo studium lidské proteinkinasy ASK1. Tento enzym patří do rodiny MAP3K kinas a v lidském organismu je součástí rozsáhlejšího multiproteinového komplexu, nazývaného ASK1 signalosom. Úkolem tohoto komplexu je přenos signálu v případě stresové situace, např. oxidativního stresu, přítomnosti zánětlivých cytokinů, přítomnosti lipopolysacharidů v organismu a dalších případných stresových podnětů. Výsledkem signalizace celé této tzv. MAPK signalizační kaskády, jejíž je ASK1 signalosom součástí, může být programovaná buněčná smrt – apoptóza. Proto není jistě překvapivé, že je zvýšená aktivita enzymu ASK1 objevená v souvislosti s řadou patologických stavů organismu a podrobně studována. Předkládaná práce se zaměřila hlavně na přípravu rekombinantního proteinu ASK1, jakož i jeho mutantních variant a na ověření enzymatické aktivity získaných proteinových preparátů. Zároveň byl rekombinantně připraven i protein 14-3-3 ζ , který je interakčním partnerem proteinu ASK1 a reguluje podstatným způsobem jeho aktivitu. Na závěr bylo potvrzeno, že připravené proteinové vzorky mohou vytvořit požadovaný komplex obou proteinů, jehož charakterizace bude předmětem dalšího studia laboratoře.

Práce má 89 stran, (včetně dvou stran příloh), 33 obrázků, obsahuje 31 tabulek a je členěna klasickým způsobem. Je psána velmi dobrou češtinou a obsahuje pouze malé množství chyb a překlepů. V úvodu autorka seznamuje čtenáře s problematikou proteinkinasy, jejich signalizačních drah a zvláštní pozornost je věnována proteinu ASK1. Na závěr této části je začleněn i text pojednávající o 14-3-3 proteinech. Celý úvod je psán barvitým a výstižným jazykem, který se dobře čte. Následuje vytyčení cílů diplomové práce, metodická část s podrobným popisem použitých technik a pracovních postupů, část představující získané výsledky a diskuse. Práci zakončuje krátké shrnutí získaných výsledků a seznam citované literatury.

Vypracování celé práce vyžadovalo od studentky jistě nemalé úsilí a trpělivost. Zkoumaný protein ASK1 byl připravován kromě divokého typu i v několika mutantních formách a stejně tak i jeho vazebný partner, protein 14-3-3 ζ byl připraven ve více variantách. Ne všechny připravované proteiny byly hned napoprvé získány v množství přiměřeném pro další studium. V některých případech byla úspěšná následná optimalizace produkce a purifikace, jejíž průběh můžeme ve výsledkové části se zájmem sledovat. Nejednalo se tedy obecně pouze o aplikace zavedených protokolů, ale do určité míry také o testování postupů nových.

K práci mám několik drobných kritických poznámek:

- 1) V metodické části by bylo rozumné pro snadnější reprodukovatelnost lépe specifikovat krok sonikace buněk, (konkrétní nastavení sonikátoru). Stejně tak v případě popisu centrifugací nevystačíme s údajem o otáčkách za minutu, ale bylo by lepší uvést absolutní údaje v násobcích tíhového zrychlení g, (např. str. 32, 42).
- 2) Na straně 60 jsem příliš nepochopil popis eluce proteinu. Text popisuje, že protein „...byl eluován do stejného objemu dialyzačního pufru. Tím se koncentrace imidazolu okamžitě snížila na jednu polovinu...“. Protože v dialyzačním pufru nebyl imidazol žádný, mám pocit,

že protein byl eluován vysokou koncentrací imidazolu stejně jako v předchozím případě, ale hned nato byly frakce naředěny stejným objemem dialyzačního pufru. Chápu to správně?

- 3) Popis os grafu chromatografických elučních profilů na str. 58 a 62 je příliš drobný a špatně se čte. Naproti tomu podobné profily na str. 54 a 56 jsou už čitelné mnohem lépe.

K práci mám tyto dotazy:

1. Způsobuje vazba ASK1 s 14-3-3 proteinem úplnou blokaci autofosforylace?
2. Proč byla pro výzkum interakce s ASK1 vybrána právě isoforma 14-3-3ζ? Lze předpokládat, že by se ostatní isoformy chovaly při interakci s ASK1 stejně nebo velmi podobně?
3. Je komplex ASK1 s proteinem 14-3-3ζ takového charakteru, že ho lze purifikovat pomocí gelové chromatografie?

Diplomová práce podle mého mínění velmi dobře splňuje všechny podmínky které jsou na ni kladeny. Doporučuji přijmout ji k další obhajobě a hodnotit stupněm výborně.

V Praze 23. 5. 2014

RNDr. Jiří Pavlíček Ph.D.