

Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Miroslavy Kacířové „Mechanismus regulace funkce fosducinu“

Předkládaná práce se zabývá studiem struktury a funkce proteinu fosducinu, který ve fotoreceptorech interaguje s G-proteinem transducinem a reguluje citlivost na světlo, ale předpokládají se u něj i další funkce, například při regulaci krevního tlaku. Vzhledem k tomu, že krystalová struktura fosducinu byla dosud popsána jen v komplexech s β a γ podjednotkami G-proteinu transducinu, jsou hlavními cíli předkládané práce charakteristiky struktury volného fosducinu, jeho částí, role fosforylace a struktura fosducinu v komplexu s regulačním proteinem 14-3-3. Disertační práce je napsána česky v plné formě. Shrnuje výsledky tří primárních publikací autorky (2 publikované, 1 podaná), které jsou přiloženy. Text práce je napsán přehledně ve standardním uspořádání včetně abstraktu v českém a anglickém jazyce a seznamu zkratk. Literární přehled začíná obecnými kapitolami o neuspořádaných proteinech a fuzzy komplexech a pokračuje kapitolami o struktuře, fyziologické funkci fosducinu a struktuře 14-3-3 proteinu. Cíle práce jsou stanoveny stručně a jasně.

V práci je použita celá řada experimentálních postupů a metod z biochemie, fyzikální chemie a biofyziky, které jsou v kapitole Metody uvedeny jen stručně jako popisy. Vzhledem k tomu, že autorka navazuje tématicky na svou diplomovou práci, odkazuje se na ni v podrobnostech některých metod. Hlavní část teoretického vysvětlení použitých metod je přesunuta do přílohy na konci práce. Metody jsou na velmi vysoké úrovni a část experimentů byla prováděna na spolupracujících specializovaných pracovištích.

Kapitola Výsledky je rozdělena do tří částí. V první jsou uvedeny výsledky exprese, purifikace a základní elektroforetické charakterizace proteinů, včetně variant s bodovými mutacemi a izotopovými záměnami. Ve druhé části výsledků jsou postupně uvedeny experimenty sloužící k zpřesnění molekulární struktury fosducinu, provedené pomocí řady pokročilých metod. Ve třetí části jsou studovány změny struktury fosducinu při fosforylaci a vazbě na 14-3-3 protein ještě bohatším spektrem metod. Diskuse a Závěr jsou stručné, zadané cíle práce byly splněny. Seznam použité literatury obsahuje úctyhodných 267 citací.

Práce je doplněna v přílohách třemi původními pracemi a jedním přehledným článkem autorky včetně doplňujících informací a uvedení podílu autorky na výsledcích.

Zvláštní příloha Teoretické základy k použitým metodám velmi podrobně objasňuje principy použitých metod. Popis řady fyzikálně chemických metod je natolik podrobný, že mohl by sloužit jako výukový materiál.

Celá práce je napsána srozumitelně a s minimem překlepů a nepřesností a bez příloh má 122 stran. Příloha Teoretické základy k použitým metodám má dalších 41 stran.

O kvalitě, experimentální úrovni a aktuálnosti dosažených výsledků není možné pochybovat i vzhledem k tomu, že dvě publikace, které obsahují většinu výsledků práce úspěšně prošly recenzním řízením v mezinárodních vědeckých časopisech.

Autorka prokázala schopnost samostatné tvůrčí vědecké práce. Proto doporučuji práci k obhajobě a doporučuji, aby byl uchazečce udělen titul PhD.

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Praha 27.11. 2016

Otázky:

Při studiu limitované proteolýzy ukazujete štěpy jen z N-koncové domény fosducinu, C-koncová doména se neštěpila, nebo tam nebyly pozorovány změny po vazbě 14-3-3 proteinu?

Při vizualizaci výsledků limitované proteolýzy chymotrypsinem na gelové elektroforéze se ukazuje, že fosforylovaný fosducin se štěpí na jiné fragmenty a pravděpodobně i rychleji než nefosforylovaný fosducin. Čím si vysvětlujete rozdíl mezi štěpením trypsinem a chymotrypsinem?

Jak vysvětlujete interakci N a C konce fosducinu po fosforylaci, když mezi oběma částmi proteinu musí existovat elektrické odpudivé síly ještě posílené fosforylací (C konec fosducinu má celkem 19 záporných nábojů a fosfátové skupiny jsou také záporně nabitě)?