

Oponentský posudek doktorské práce

Miroslava Kacířová: Mechanismus regulace funkce fosducinu

Cílem předkládané práce bylo studium proteinu fosducinu, důležitého zejména v procesu vidění a výzkum interakce této biomolekuly s adaptorovým proteinem 14-3-3. Tato interakce významně reguluje fyziologickou funkci fosducinu, nicméně unikala až doposud podrobnější strukturní charakterizaci. Důvod spočíval zejména v tom, že fosducin patří mezi takzvané vnitřně neuspořádané proteiny a i po vazbě na protein 14-3-3 zůstává řada jeho oblastí v této neuspořádané podobě. Takto vzniklý komplex (patřící tím mezi tzv. „fuzzy komplexy“) není pro svoji velkou flexibilitu vhodný k výzkumu pomocí proteinové krystalografie a je ho tedy nutno zkoumat prostřednictvím jiných metod biofyzikální chemie a biochemie. Tato doktorská práce je příkladem právě takového výzkumu a nutno říci předem, že příkladem velmi zdařilým.

Doktorská práce Miroslavy Kacířové má 257 stran a je rozdělena do těchto částí: Úvod, Literární přehled, Cíl práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuse, Závěr, Publikace a Teoretické základy k použitým metodám. Část „Publikace“ obsahuje text čtyř vědeckých prací (tři publikovaných, jedné doposud v recenzním řízení), kterých je kandidátka spoluautorkou. Na dvou z těchto prací je její jméno uvedeno na prvním místě. Celá doktorská práce je poměrně rozsáhlá, přesto působí vnitřně konzistentním dojmem a dobře se čte. Nepostřehnu jsem v ní žádné překlepy ani tiskové chyby. V části Literárního přehledu se autorka sympaticky pokouší jednotlivá předkládaná fakta spolu propojit do logického celku. Část Diskuse je na takto rozsáhlou práci poměrně velmi krátká, ovšem čtenář zjistí, že velmi mnoho z toho, co bývá součástí diskuse, obsahuje již předchozí část Výsledky. Určitou zvláštností je závěrečná část „Teoretické základy k použitým metodám“, která typicky součástí podobných prací nebývá. Bylo by zřejmě logičtější umístit ji v textu poněkud dříve, nejspíš hned vedle „Materiálu a metod“, nebo ji s nimi zcela sloučit. Především je ale nutno zdůraznit, že je to kapitola velmi dobře psaná a stane se nejspíš pomůckou studentům, kteří budou hledat úvodní texty, jež by je seznámily s popisovanými metodami.

Pokud se týká vědeckého hodnocení předkládané práce, považuji ji za názorný příklad toho, jak lze dohromady skloubit výsledky celého spektra biofyzikálně chemických a biochemických metod tak, aby z nich bylo možno poskládat ucelený obraz interakce dvou biomolekul. Přitom každá z používaných metod poskytla pouze částečný vhled a finální obraz není prostým součtem získaných výsledků, ale jejich promyšlenou logickou kombinací. V předkládané práci je tento obraz reprezentovaný výsledným modelem proteinového komplexu. Je pochopitelné, že ne všechny používané metody zvládala kandidátka na stejné úrovni a že pracovala jakožto součást větších týmů. Proto je v práci její podíl na získání jednotlivých výsledků jasně specifikován.

K práci mám tyto komentáře:

1. Často používaný výraz „tmou adaptovaná sítnice“ mi připadá mírně toporný. Snad by šlo lépe použít: „sítnice adaptovaná na tmu“.
2. Na několika místech (např. str. 31) je použit přívlastek „kryší“. Ve skutečnosti se zřejmě jedná o „potkání“; (*Rattus rattus* vs. *Rattus norvegicus*).
3. Kvalita obrázků je v naprosté většině velmi dobrá. V případě studia vložených grafů distribuce sedimentačních koeficientů na straně 73 jsem se ale ocitl na hraně svých zrakových možností, stejně jako při rozlišování plných a prázdných koleček v grafech poklesu anizotropie fluorescence, např. na str. 84.

Rád bych kandidátce položil následující dotazy:

- A) Ve své práci jste používala celou řadu proteinových mutantů fosducinu, např. Q52K, či celou sérii cysteinových a tryptofanových mutantů. Prováděla jste nějaké předběžné testy, zda tyto mutanty zachovávají základní funkční charakteristiky původního divokého typu proteinu?
- B) V celém širokém spektru použitých metod chybí mapování struktury pomocí chemického zesíťování (cross-linking). Byly podobné experimenty zvažovány?
- C) Domníváte se, že extrémně vysoká neuspořádanost komplexu fosducinu s proteinem 14-3-3 je skutečný rys fyziologicky funkčního komplexu, nebo je to spíše jen náznak toho, že výsledný komplex má obsahovat ještě dalšího stabilizujícího partnera?

Uvedenými komentáři nechci ani v nejmenším snižovat vysokou kvalitu předkládané práce. Pokládám ji za vynikající a doporučuji přijmout k další obhajobě.

V Praze, 23. listopadu 2016

RNDr. Jíří Pavlíček, Ph.D.