

Posudek školitele na diplomovou práci Bc. Jiřího Šimůnka:

“Studium posttranslačních modifikací fosducinu“

Fosducin (Pdc) je klíčovým regulátorem G proteinové signalizace v procesu vidění. Tento protein existuje ve dvou formách: fosforylované, která se tvoří ve tmě, a nefosforylované, která vzniká za přítomnosti světla. Nefosforylovaná forma má vysokou afinitu ke komplexu $G_i\beta\gamma$, kdežto po fosforylaci je afinita k tomuto komplexu nízká. Důvodem nízké afinity fosforylovaného fosducinu vůči $G_i\beta\gamma$ je pravděpodobně jeho interakce s regulačním proteinem 14-3-3. Navázání proteinu 14-3-3 na fosducin by mohlo mít i další funkce jako je např. ochrana/zpomalení defosforylace fosforylovaného fosducinu. Vzhledem k tomu, že N-terminální doména Pdc je inherentně nestrukturovaný protein, který je navíc fosforylován, bylo také spekulováno, že tvorba komplexu může chránit tuto část molekuly Pdc před proteolytickou degradací. Prvním cílem diplomové práce Bc. Jiřího Šimůnka bylo prostudovat vliv vazby proteinu 14-3-3 na defosforylaci fosforylovaných vazebných motivů Pdc obsahujících pSer54 a pSer73, SUMOylaci Pdc na Lys33 a na štěpení Pdc vybranými proteasami. Druhým cílem bylo porovnat význam obou fosforylovaných motivů pro vazbu Pdc na protein 14-3-3.

Bc. Jiří Šimůnek nejdříve připravil jak protein 14-3-3 $\zeta\Delta C$, tak i Pdc a provedl jeho fosforylaci na Ser54 a Ser73. Následně pomocí SDS-PAGE s gely obíhajícími tzv. phos-tag studoval vliv tvorby komplexu na rychlost defosforylace Pdc fosfátasami PP1 a PP2A. Poté studoval vliv tvorby komplexu na proteolytickou degradaci Pdc. V obou případech potvrdil protektivní efekt tvorby komplexu, tedy výrazné zpomalení defosforylace a zpomalení štěpení Pdc proteasami. V další části práce se pokusil provést SUMOylaci Pdc na Lys33, tak jak byla popsána v literatuře s cílem následně sledovat vliv tvorby komplexu na tuto modifikaci. Nicméně i přes mnoho opakování a modifikací protokolu se nepodařilo Pdc SUMOylovat. V poslední části práce se Bc. Jiří Šimůnek věnoval porovnání vazebné afinity syntetických fosfopeptidů reprezentujících 14-3-3 vazebné motivy Pdc pomocí změn stacionární anisotropie fluorescence. Tato měření ukázala, že protein 14-3-3 váže oba motivy se srovnatelnou afinitou, která je však mnohem nižší než vazebná afinita celého Pdc. To naznačuje, že výsledná vazebná afinita Pdc k proteinu 14-3-3 je výsledkem synergie vazby obou motivů a pravděpodobně i interakcí zahrnujících další oblasti molekuly Pdc.

Výsledky diplomové práce Bc. Jiřího Šimůnka posunuly naše znalosti o úloze proteinu 14-3-3 v procesu regulace Pdc. Bc. Jiří Šimůnek na své práci pracoval samostatně a dosáhl stanovených cílů. Proto doporučuji přijmout diplomovou práci Bc. Jiřího Šimůnka k obhajobě.

V Praze 19.5. 2016

Prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie
PřF UK v Praze