

# Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic

---

Jan Konvalinka PhD  
Proteases of Human Pathogens  
Flemingovo n. 2  
166 10 Praha 6  
Czech Republic

Telephone +420 220183 218  
fax +420 220 183 578  
e-mail konval@uochb.cas.cz

24.11. 2012

## Oponentský posudek na práci

### Studium úlohy proteinů 14-3-3 v regulaci G-proteinové signalizace

#### **Doktorská disertační práce**

*Mgr. Lenka Řežábková*

Mgr. Lenka řežábková předkládá disertační práci, vypracovanou na katedře fyzikální a makromolekulární chemie PŘF UK v Praze a na Fyziologickém ústavu AV ČR. Práce je vypracována formou souhrnu v obvyklém členění (úvod, cíle práce, materiály a metody, výsledky a diskuse a závěr), ke kterému jsou jako přílohy přičleněny čtyři práce, jejichž je kandidátka významnou spoluautorkou, a které byly publikovány v prvotřídních oborových časopisech. U tří z nich je kandidátka první autorkou, u čtvrté druhou, a její autorský podíl, dobře vysvětlený v disertaci, je nepochybný. Lenka Řežábková je mimoto spoluautorkou dalších tří velmi kvalitních publikací týkajících se strukturní biologie proteinů, které nebyly zařazeny do této disertační práce.

Podle Web of Science tyto práce od uveřejnění nasbíraly už 23 (kterých navíc stále přibývá), což jen potvrzuje atraktivitu tématu a zajímavost publikovaných výsledků.

Autorka ve své disertační práci popisuje studium interakce proteinu 14-3-3 s negativními regulátory signalizace spřažené s G-proteinem (RGS) a s proteinem fosducinem, regulátorem transducinu, který zprostředkovává přenos signálu při procesu vidění. Práce byla vypracována v laboratoři Doc. Obšila, kterému během posledních deset let v oblasti biofyzikální chemie proteinu 14-3-3 a jeho interakce se signálními a regulačními proteiny podařilo vybudovat vědeckou školu a získat velký mezinárodní respekt. Kolegyni lze k výběru laboratoře a školitele pográtulovat.

Disertantka jasně prokázala, že si velmi dobře osvojila celou škálu experimentálních technik, od klonování rekombinantní DNA a exprese proteinů v *E. coli* a jejich purifikaci, *in vitro* fosforylaci a modifikaci fluorescenčními sondami, až po biofyzikální techniky, jako je analytická centrifugace, měření anisotropie fluorescence, časově rozlišená fluorescence, proton-deuteriová výměna a další moderní metody studia proteinových struktur a jejich interakcí s ligandy nebo dalšími proteiny. Studentka také potvrzuje schopnost racionálně experimenty analyzovat a střízlivě zhodnotit jejich výsledky

Práce je napsaná v českém jazyce, což je dnes u disertační práce v tomto oboru skoro výjimka. Bohužel se zdá, že autorka české verzi své práce věnovala méně pozornosti, než bezpochyby věnuje svým anglickým rukopisům. V práci je řada gramatických chyb, včetně opakované chyby v názvu fakulty Karlova učení (např. na str.42) nebo názvu našeho státu (str. 11), a také chyb v českém skloňování a shodě podmětu s přísudkem. Chyby jsou občas (jako na str. 34 a 42) nahromaděny tak, že to už ztěžuje porozumění textu. V českém chemickém textu by se neměly objevovat termíny jako „treonin“ (str. 20 a jinde) nebo „etanol“ (opět nepovedená str. 42). Nervový systém není „sympatetický“ (str. 34 dole). Text je v řadě úseků redundantní: autorka používá identické formulace v různých oddílech práce, což ve čtenáři vyvolává nepřetržitý pocit *deja vu*: celé pasáže z Úvodu jsou znovu, skoro doslova opakovány v souhrnech jednotlivých prací v kapitole 5. V práci je uveden užitečný seznam zkratk, ale přesto by bylo dobré vždy při prvním použití zkratky ji vysvětlit.

Přes tyto formální výhrady a stížnosti je práce kolegyně Řežábkové další ukázkou toho, jak se v Obšilově laboratoři kombinací řady biofyzikálních metod a špičkové strukturní biologie řeší složité problémy interakce proteinů řady 14-3-3 s regulačními proteiny RGS a transducinem. Jde o nesmírně živou problematiku, na které pracuje řada týmů z prestižních světových pracovišť: tím spíš je nutno ocenit schopnost disertantky v této konkurenci na tak vysoké úrovni obstát.

Jako podklad pro diskusi bych disertantce rád položil následující otázky:

1/ je opravdu překvapivě, že při tom, jak dlouho jsou proteiny 14-3-3 a jejich interakční partneři známi a jak velké úsilí je do jejich studia věnováno, existuje tak omezený soubor struktur komplexů těchto proteinů s ligandy, ať už pomocí rentgenové difrakce nebo NMR. Proteiny 14-3-3 přitom nejsou membránové a lze je zřejmě relativně snadno připravit v *E. coli*. Čím si to disertantka vysvětluje?

2/ Je zajímavé, že fosducin interaguje s 26S podjednotkou proteasomu. Je známo, jestli je tento protein ubikvitylován? Je známa jeho E3 ligasa? A jak je to s proteiny RGS?

3/ Protein 14-3-3 je dimer. Autorka uvádí, že isoforma sigma tohoto proteinu je v roztoku přítomna ve formě monomeru. Jakou roli tyto monomery hrají? Nemohou mít jiné interakční partnery než jim odpovídající dimerní proteiny?

Na závěr s potěšením konstatuji, že předložená disertační práce Lenky Řežábkové je vynikající i podle nejpřísnějších mezinárodních měřítek, zcela naplňuje požadavky příslušných zákonných ustanovení a proto ji bez výhrad doporučuji k obhajobě.

Jan Konvalinka