

Posudek oponenta na diplomovou práci

„Studium posttranslačních modifikací fosducinu“

Předkladatel: Bc. Jiří Šimůnek

Studijní obor Biofyzikální chemie, PřF UK v Praze

Diplomová práce Bc. Jiřího Šimůnka se zabývá studiem fosducinu, proteinu pocházejícího například z fotoreceptorových buněk sítnice, jehož fyziologické funkce nebyly stále plně a detailně objasněny. Autor v předkládané práci studuje úlohy posttranslačních modifikací fosducinu při jeho interakci s proteinem 14-3-3 ζ a také se zabývá charakterizací vlivu vzniklého proteinového komplexu na tyto modifikace.

V teoretické části práce se diplomant věnuje problematice spojené s fosducinem a jeho vazebnými partnery G-proteiny a proteiny 14-3-3. Dále v experimentální části popisuje provedené exprese a purifikace proteinu 14-3-3 ζ Δ C a mutantní formy fosducinu PdQ52K a také fosforylaci fosducinu pomocí proteinkinasy A na Ser54 a Ser73 – aminokyselinových zbytcích klíčových pro vazbu proteinu 14-3-3 ζ . Následně diplomant uvádí popis experimentů ověřujících vliv vazby proteinu 14-3-3 ζ na rychlost defosforylace fosducinu a také na jeho limitovanou proteolýzu. Jedním z dílčích cílů bylo také podání důkazu SUMOylace fosducinu při *in vitro* pokusech, avšak tyto experimenty nakonec nebyly úspěšné. V závěru práce diplomant prezentuje výsledky získané pomocí měření stacionární anizotropie fluorescence a porovnává vazebné afinity peptidů obsahujících fosforylované motivy fosducinu k proteinu 14-3-3 ζ .

Práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických nebo pravopisných chyb. Bohužel některé části teoretického úvodu a metod se shodují s již obhájenou bakalářskou prací Bc. Jiřího Šimůnka. Teoretický úvod je samozřejmě doplněn velkým množstvím informací, které v bakalářské práci uvedeny nebyly. Pro správnost mělo být v úvodu zmíněno, že předkládaná diplomová práce navazuje na již obhájenou bakalářskou práci, která měla být také řádně citována. Ve většině případů navíc chybějí v textu odkazy na příslušné obrázky. Dále u odkazů na kapitoly a obrázky chybějí čísla příslušných stránek a některé odkazy a číslování obrázků jsou chybné. Rozsah diplomové práce a její členění je v pořádku. Výskyt překlepů a formulačních nepřesností je nízký a k odborné správnosti práce nemám žádné výhrady.

K předkládané diplomové práci mám následující dotazy:

1. V kapitole o nestrukturovaných proteinech píšete, že mohou být příčinou různých onemocnění. Můžete uvést nějaké konkrétní příklady?
2. Ze kterého organismu pocházejí geny využitě pro expresi Vámi studovaných rekombinantních proteinů?
3. Z jakého důvodu byl pro Váš výzkum použit protein 14-3-3 ζ Δ C a ne jeho přirozená forma?
4. Proč se na gelu z obrázku 5.14 objevuje protein 14-3-3 ve dvou různých zónách a na obrázku 5.15 nikoliv? Jaká forma fosducinu se nachází v nepopsaných vrchních zónách všech předložených polyakrylamidových gelů z obrázků 5.14 a 5.15?
5. Máte nějaké vysvětlení, proč nebylo možné fosducin PdQ52K při *in vitro* pokusech SUMOylovat?

Závěrem konstatuji, že předložená diplomová práce Bc. Jiřího Šimůnka splňuje požadavky kladené na diplomovou práci. Student prokázal schopnost vědecky pracovat a prezentovat dosažené výsledky. Navrhuji tuto práci uznat jako práci diplomovou, avšak klasifikovat známkou chvalitebně, z důvodu výše uvedených formálních nedostatků.

V Praze dne 19. 5. 2016

RNDr. Miroslava Alblova, Ph.D.

Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.
Václavská 1083
142 20 Praha 4

e-mail: miroslava.alblova@fgu.cas.cz
tel: +420 241 062 249