

## POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Předložená diplomová práce Bc. Lenky Řežábkové nazvaná „Vliv vazby 14-3-3 proteinu na strukturu RGS domény proteinu RGS3“ se zabývá významným problémem regulace G-proteinové signalizace. RGS proteiny jsou multifunkční signální proteiny, které regulují G-proteinovou signalizaci tím, že fungují jako tzv. GAP proteiny. RGS se přímo váží na aktivovanou G $\alpha$ -GTP podjednotku a urychluje hydrolýzu navázaného GTP a tím ukončuje přenos signálu. Vzhledem k biologickému významu RGS proteinů je jejich aktivita přísně regulována. Jedním ze způsobů regulace některých RGS proteinů je fosforylace a následná vazba 14-3-3 proteinu, který inhibuje GAP aktivitu RGS. Mechanismy regulace aktivity RGS proteinů jsem zatím relativně málo prozkoumané a jejich objasnění proto může významně přispět k pochopení funkce těchto důležitých bílkovin.

Mezi hlavní cíle práce patřila příprava tří mutantních verzí RGS3 proteinu obsahující pouze jeden tryptofanový zbytek, jejich fosforylace a studium strukturních změn RGS domény pomocí metod časově-rozlišené tryptofanové fluorescence.

K dosažení vytčených cílů musela Lenka Řežábková zvládnout nejen metody molekulární biologie a exprese a purifikace rekombinantních proteinů, ale i biofyzikální techniky fluorescenční spektroskopie. Lence Řežábkové se podařilo všechny tři proteiny úspěšně připravit, provést jejich fosforylacii, charakterizovat jejich interakci se 14-3-3 proteinem a nakonec realizovat fluorescenční měření. Tato měření ukázala, že: (a) 14-3-3 protein interaguje s RGS3 prostřednictvím fosforylovaného serinu 264, (b) vazba 14-3-3 proteinu mění konformaci RGS domény v okolí tryptofanu 424, který je blízko vazebného místa pro G $\alpha$  podjednotku, (c) samotná RGS doména také interaguje se 14-3-3 proteinem. Tyto výsledky tedy ukazují, že vazba 14-3-3 na fosforylovaný RGS3 ovlivňuje strukturu RGS domény. To by mohlo vysvětlovat inhibici GAP aktivity.

Diplomová práce Lenky Řežábkové je formálně i jazykově na dobré úrovni s dobrou proporcí mezi teoretickou a výsledkovou částí, kdy výsledky a jejich diskuse zabírají přibližně třetinu z celkového počtu 54 stran. Citované prameny jsou dostatečné a relevantní. Práce je psána velmi pečlivě s minimem překlepů. Z formálního hlediska bych práci vytknul několik neobratných formulací.

K práci mám následující komentáře a upřesňující dotazy:

- 1) Obsahuje RGS doména fosforylační místa? Je možné, že *in vivo* je interakce mezi 14-3-3 a RGS doménou RGS3 řízena fosforylací RGS domény?
- 2) Máte nějaké vysvětlení proč mutant RGS3 obsahující Trp295 agregoval a mutanty s Trp391 a Trp424 neagregovaly?
- 3) V diskusi na str. 51 zmiňujete měření GAP aktivity vašich proteinů v laboratoři doc. P. Svobody. Můžete stručně popsat jakým způsobem byla GAP aktivita měřena?

Závěrem mohu konstatovat, že předložená práce Lenky Řežábkové je velmi kvalitní a zcela splňuje požadavky kladené na diplomovou práci. Studentka prokázala schopnost vědecky pracovat a prezentovat dosažené výsledky. Proto navrhuji tuto práci uznat jako práci diplomovou a hodnotit známkou výborně.

V Praze dne 18.5. 2009

---

Ing. Jan Feisinger, CSc.  
FGÚ AV ČR, v.v.i.

