

POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Předložená diplomová práce Bc. Miroslavy Kacířové nazvaná „**Studium struktury komplexu 14-3-3:fosfoducin**“ se zaměřila na biofyzikální charakterizaci komplexu 14-3-3 proteinu s fosfoducinem. Tato diplomová práce představuje první část rozsáhlého projektu, jehož hlavním cílem je studium struktury komplexu 14-3-3 protein/fosfoducin a pochopení mechanismu regulace funkce fosfoducinu. Pozornost byla věnována zjištění molární stechiometrie komplexu a disociační konstanty komplexu K_d , dále odhalení nekrytých míst na fosfoducinu interagujícího se 14-3-3 proteinem a studiu konformačních změn fosfoducinu způsobených vazbou 14-3-3 proteinu.

Díličními cíly předložené práce, které byly všechny úspěšně splněny, byly exprese různých forem 14-3-3 proteinu (delta C a wt) v bakteriích a jejich následná purifikace s cílem získat miligramová množství proteinů. Podobně byly exprimovány jejich mutantní formy, kde tryptofanové zbytky byly nahrazeny jinými aminokyselinami. Studentka rovněž exprimovala v bakteriích fosfoducin a získala ho v dostatečném množství a odpovídající čistotě. Stejným způsobem získala v dostatečném množství a čistotě několik mutantních forem fosfoducinu. A podařilo se jí pomocí PKA *in vitro* fosforylovat všechny purifikované formy fosfoducinu. Dále sledovala pomocí nativní elektrofororézy vznik komplexu 14-3-3/fosfoducin a ověřila nutnost fosforylace fosforylačních míst dvou serinových zbytků na fosfoducinu pro vznik komplexu. Limitovanou proteolýzou charakterizovala flexibilní oblasti fosfoducinu v závislosti na jeho vazbě se 14-3-3 proteinem a prokázala, že vazba 14-3-3 proteinu mění konformaci fosfoducinu. Za pomoci ultracentrifugačních technik zjistila stechiometrii komplexu 14-3-3 proteinu/-fosfoducin s výsledkem 2:1, což značí, že dva monomery 14-3-3 proteinu interagují s jedním fosfoducinem a odhadla disociační konstantu K_d tohoto komplexu. Pomocí časově-rozlišené tryptofanové fluorescence popsala konformační změny fosfoducinu způsobené vazbou proteinu 14-3-3. Dále zjistila, že samotná fosforylace fosfoducinu má pouze malý vliv na jeho flexibilitu. Měření časově- rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence dále potvrdilo že 14-3-3 protein se váže s nejnižší afinitou k nefosforylovanému fosfoducinu. Nejsilnější vazebná interakce byla zjištěna s fosforylovaným mutantem fosfoducinu Q52K.

K dosažení vytčených cílů musela Miroslava Kacířová zvládnout rozličné metody molekulární biologie, purifikace proteinů a různé biofyzikální metody. Diplomová práce Miroslavy Kacířové je formálně i jazykově na dobré úrovni s dobrou proporcí mezi teoretickou a výsledkovou částí, kdy výsledky a jejich diskuse zabírají přibližně polovinu z celkového počtu 79 stran. Citované prameny jsou dostatečné a relevantní. Práce je psána velmi pečlivě s minimem překlepů. Z formálního a grafického hlediska nelze předloženou práci rovněž nic závažného vytknout.

K diplomové práci mám následující dotazy:

- 1) Jsou ještě na fosfoducinu předpokládána další místa pro fosforylaci na serinových zbytcích případně na jiných amino kyselinových zbytcích např. tyrosinu?
2. Proč byla použita metoda ultracentrifugace k detekci tvorby komplexu 14-3-3 protein-fosfoducin a nebyly využity možnosti třeba metod CD a nebo surface plasmon resonance?
3. Jsou známy analogy fosfoducinu též např. v modelových genomech rostlin jako je *Arabidopsis thaliana*?
4. Existují nějaké knock out studie genu fosfoducinu např. u myší a jak se projevují?

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

V Praze dne 8.9. 2011

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