

Posudek oponenta na doktorskou práci RNDr. Petra Váchy: Studium interakce forkhead transkripčního faktoru FOXO4 s DNA a s proteinem 14-3-3

Předkládaná práce „Studium interakce forkhead transkripčního faktoru FOXO4 s DNA a s proteinem 14-3-3“ studuje pomocí řady pokročilých metod mezimolekulové interakce a geometrii molekuly proteinu FOXO4. Mapování detailů interakcí mezi transkripčními faktory, DNA a dalšími regulačními molekulami je velmi důležité, protože na této úrovni se rozhoduje o expresi genů a dalším směřování činnosti buňky, jako je například apoptóza nebo zvrát v nádorovou buňku.

Práce je napsána s minimem překlepů a chyb, má standardní členění, 119 stran textu a je založena na třech publikacích autora, které jsou v příloze. Je jen škoda, že u přiložených kopií autorových článků jsou kvůli zmenšení hůře čitelné texty k obrázkům.

Literární přehled shrnuje současné představy o struktuře a funkci FOXO proteinů a zejména o interakci proteinu FOXO4 s DNA a regulačními faktory 14-3-3.

Hlavní část Metod tvoří podrobný popis přípravy, izolace, purifikace a modifikací proteinových konstruktů, které byly dále studovány sérií fyzikálněchemických metod, které jsou popsány ve druhé části metod. Při podrobném popisu preparačních a purifikačních procedur vzniká ale problém, že řada popisů se v některých částech doslovně několikrát opakuje. Je otázka, zda by stručnější, ale jinak strukturovaný popis neposloužil stejně. K charakterizaci různých aspektů interakce a struktury proteinů byl využity velmi pokročilé experimentální techniky, jako je měření anizotropie fluorescence, časově rozlišené fluorescence, Foersterova přenosu energie a resonance povrchových plasmonů. Byly využívány jak přirozeně přítomné fluorofory (tryptofan), tak i specifické značení pomocí fluorescenčních sond (AEDANS a fluorescein). Takováto kombinace metod poskytuje komplexní pohled na vztah mezi strukturou a funkcí studovaných molekul. Cenné původní výsledky zahrnují lokalizaci míst mezimolekulárních interakcí, měření vzdáleností funkčních skupin a stanovení rychlostních konstant a kinetického modelu interakce vazebné domény s molekulou DNA. Diskuse výsledků je přiměřená a stanovené cíle práce byly splněny. Seznam literatury obsahuje 115 citací. Publikované experimentální výsledky úspěšně prošly recenzním řízením v renomovaných mezinárodních časopisech. Proto nemůže být pochyb o kvalitě a aktuálnosti výsledků, vhodnosti a úrovni použitých metod a interpretaci výsledků. Předkládaná práce má celkově vynikající úroveň jak po formální, tak po obsahové stránce a dosažené výsledky jsou velice hodnotné. Autor bezpochyby prokázal schopnost samostatné tvůrčí vědecké práce, splnil požadavky kladené na doktorskou práci, a proto doporučuji, aby mu byl udělen titul PhD.

V Praze 19.8. 2015

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Otázky:

- 1) Jakým způsobem jste porovnávali změny v době života excitovaného stavu sondy AEDANS navázané na různě umístěné molekuly cysteinu (tabulka 2. na str. 90)? Samotné difference v době života u volného fosforylovaného proteinu a proteinu obsazeného 14-3-3 proteinem nenaznačují závěry uvedené v textu. Použili jste nějaké složitější metody porovnávání?
- 2) Při výpočtu absolutní vzdálenosti mezi fluorofory pomocí Foersterova přenosu energie je potřeba znát orientační faktor zohledňující úhel mezi dipólem přechodu donoru a akceptoru. Jak jste ho určili nebo odhadli?
- 3) Když se vám podařilo získat sadu rychlostních konstant pro interakci s DNA pro přirozený FOXO4 protein a varianty s různými mutacemi, bylo by možné využít tuto sadu konstant například k analýze vztahu rychlostních konstant s volnou energií rovnovážných stavů a tím energetiky interakce?

Drobné nepřesnosti, které nijak nesnižují vysokou úroveň práce:

Str. 23 „protein-voda-fosfátová skupina báze“ je nepřesná formulace – fosfátová skupina není součástí „báze“. Správnější by bylo „fosfátová skupina řetězce“.

Str. 34 trehalosa – má být trehalasa

Str. 46 směs deoxyribonukleotidů- má být směs deoxyribonukleotid fosfátů

Str. 45 a 47 koncentrace dNTP ve směsi na PCR reakci je hodně různá, je pravděpodobné, že údaj 4 μM na straně 45 je chybný

Str. 49 co znamená 1 x koncentrovaný pufr?

Str. 86 a 87 Hovoří se o měření fluorescence vzorku, což je poněkud zavádějící. Přestože v Metodách je správně popsáno, že jde o změny anizotropie, které odrážejí změny v pohyblivosti, bylo by asi správnější i zde zdůraznit, že jde o anizotropii a ne o intenzitu.

Str. 94 „depolarizace“ anizotropie - nemělo by být spíše „dohasínání“ anizotropie?