

Oponentský posudek doktorské práce

Petr Vácha: Studium interakce forkhead transkripčního faktoru FOXO4 s DNA a s proteinem 14-3-3

Cílem doktorské práce Petra Váchy bylo detailnější objasnění interakce jednoho z významných forkhead transkripčních faktorů nazývaného FOXO4 s jeho přirozenými interakčními partnery – se dvěma kanonickými sekvencemi DNA a s regulačním proteinem 14-3-3. Vzájemná interakce těchto partnerů se podílí na regulaci důležitých procesů uvnitř buňky, včetně řízení buněčného cyklu, reakce na stres a spouštění programované buněčné smrti - apoptózy. Zkoumané proteiny byly nejprve připraveny metodami rekombinantní exprese v baktériích *E. coli* a následně purifikovány sérií chromatografických kroků. Vlastní výzkum interakcí využíval především měření stacionární fluorescence, časově rozlišené fluorescence a měření metodou SPR. K experimentům byly využívány různé proteinové mutanty umožňující fluorescenční zkoumání, případně mutantní proteiny značené fluorescenčními sondami.

Práce Petra Váchy má 152 stran, je psána česky a je členěna klasickým způsobem. V příloze obsahuje tři publikace; na jedné z nich je kandidát uveden na prvním místě. V úvodu celé doktorské práce je čtenář nejprve obsáhle seznámen s problematikou transkripčních faktorů rodiny FOXO, jejich interakcí s DNA a rovněž s rodinou 14-3-3 proteinů a jejich regulačním působením. Dále jsou vytčeny cíle práce a popsány experimentální metody použité v průběhu výzkumu. Následuje kapitola obsahující výsledky, kapitola obsahující diskusi a stručný závěr. Poslední částí práce jsou přílohy obsahující jednak kopie výše zmíněných publikací kandidáta a jednak sekvence proteinových konstruktů a schémata použitých vektorů.

Domnívám se, že předložená práce má vysokou vědeckou hodnotu a představuje detailní analýzu interakcí studovaných molekul pokročilými metodami biofyzikální chemie. Za zvlášť významný považuji fakt, že část uvedených výsledků umožňuje vytvářet závěry o povaze interakcí v takových oblastech proteinu FOXO4, které nejsou součástí dostupných krystalových struktur. Stejně tak je na základě zde uvedených výsledků možno lépe pochopit flexibilitu jednotlivých částí proteinů při vzájemných interakcích, což je rovněž parametr, který nelze jednoduše posoudit na základě rentgenostrukturní analýzy. Důležitým závěrem práce je zjištění skutečnosti, že interakce 14-3-3 proteinu zakrývá na svém vazebném partnerovi FOXO4 vazebné místo pro DNA a tak zabraňuje jeho interakci s touto molekulou. Práce je výborným příkladem toho, jak mohou být studovány interakce komplexů biomolekul metodami biofyzikální chemie.

K práci mám tyto připomínky:

1. V průběhu celého výzkumu bylo použito poměrně velké množství proteinových konstruktů a jejich jednotlivých mutantů. Přehlednost práce by zvýšilo, kdyby byly v rámci jedné kapitoly (nejlépe na začátku sekce Výsledky) popsány, charakterizovány (např. i graficky naznačeny) a zároveň i vysvětlen důvod jejich navržení. Na str. 43 je sice stručná pasáž o navržených

konstruktech, ale podle mého názoru by bylo lépe ji rozšířit a umístit spíše mezi výsledky, než mezi metody.

2. Práce je psána vcelku srozumitelně, přestože někdy jsou použité poněkud těžkopádné formulace. Termín „báze-specifické vazby“ použitý na str. 112 mi přijde jako příliš otrocký překlad z angličtiny. Větší počlivost mohla být věnována grafické stránce prezentace některých výsledků, neboť jsou občas špatně čitelné, případně nedokonale zpracované (např. obr. 31 na str. 82, obr. 52 na str. 111, či tab. 5 na str. 97).
3. Je poměrně nezvyklé číst uprostřed českého textu v rámci citací česká příjmení (Obsil, Bouřa) neustále bez české diakritiky.
4. Při popisu použitých metod je občas při popisu centrifugace používán pouze údaj o otáčkách za minutu (např. str. 51, 52). To jistě není dostatečná charakterizace. Použití termínu „ultracentrifugace“ na str. 52 není myslím zcela vhodné, neboť je ho zvykem užívat spíše pro centrifugace s mnohem vyšším zrychlením, než bylo použito zde.

Dále bych rád položil kandidátovi následující dotazy:

A. Pro vytvoření modelu komplexu FOXO4 s 14-3-3 proteinem bylo použito 6 hodnot mezimolekulárních vzdáleností získaných pomocí FRET experimentu. Byl podobný model vytvořen nejprve bez této znalosti a dalo by se tak říci, jak významně se tento experiment podílel na jeho vylepšení?

B. V průběhu SPR experimentu byl pozorován pozitivní vliv zvýšené délky injekce analytu na stabilitu komplexu FOXO4 s DNA. Šlo by podrobněji diskutovat tento efekt a pokusit se ho vysvětlit?

C. 14-3-3 proteiny interagují se svými vazebnými partnery často na základě interakce s fosforylovanými aminokyselinovými zbytky, ale v některých případech fosforylaci vazebného partnera nepotřebují. Jsou známé případy, kdy by k požadované interakci byla nutná acetylace vazebného partnera?

Výše uvedené připomínky nemají naprosto za cíl snižovat kvalitu práce. Považuji ji za velice hodnotnou. Tato doktorská práce velice dobře splňuje všechny podmínky které jsou na takovou práci kladeny a plně ji doporučuji přijmout k další obhajobě.