

Posudek na doktorskou práci Mgr. J. Šilhána „Studium molekulárních mechanismů funkce 14-3-3 proteinů“.

Předkládaná práce se zabývá studiem struktury, funkce a interakcí 14-3-3 proteinu a několika jeho vazebných partnerů. Práce je založena na 3 již vyšlých publikacích a jednom článku v recenzním řízení a je sepsána ve zkrácené formě jako úvodní text, který doprovází přiložené články.

Vlastní text má 59 stran a má standardní členění na Literární přehled, Metody, Výsledky, Závěr a Seznam citované literatury. V literárním přehledu jsou shrnuty základní informace o 14-3-3 proteinech a skupině FOXO proteinů. Hlavní cíle práce ukazují, kterým z více aspektů uvedených v člancích se autor přímo věnoval. Kapitola Metody sumarizuje všechny postupy použité v práci, většinou ve formě přehlednější, než je uvedeno v publikacích. Zvláštní důraz je kladen na metody molekulárně biologické, biochemické a fluorescenční spektroskopii. Výsledková část je rozdělena podle témat přiložených článků a uvádí, jaký podíl měl autor na jednotlivých tematikách a metodách. Jsou zde uvedena i některá dosud nepublikovaná data krystalové struktury 14-3-3 proteinu s peptidovým ligandem. Text je napsán přehledně a drobné chyby a nepřesnosti nesnižují hodnotu předkládané práce.

V práci je využito celé spektrum mnoha různých metod na velmi pokročilé úrovni, jak je dnes vyžadováno v kvalitních časopisech. Metody molekulární biologie byly použity k přípravě a expresi studovaných proteinů, jejich částí a mutovaných variant. Řada biochemických metod byla použita k izolaci exprimovaných proteinů, jejich čištění a modifikaci například fosforylací. K ověření identifikace použitých proteinů a jejich modifikovaných variant byla využita hmotnostní spektrometrie. K detekci a kvantifikaci interakce proteinů bylo využito fluorescenčního značení. K určování struktury a geometrie byla využita krystalizace proteinů, rentgenová strukturní analýza, Försterův rezonanční přenos energie a měření spekter cirkulárního dichroismu. Získaná strukturní data byla srovnávána s výpočetními modely získanými metodami molekulární dynamiky. Byla prováděna i měření dob života fluorescence a dohasínání anisotropie pomocí měření časově rozlišené fluorescence.

Výsledkem práce je řada originálních poznatků o struktuře a funkci jednotlivých částí 14-3-3 proteinu v jeho interakci s proteinem FOXO4 a DNA, se serotonin N-acetyl transferasou a tyrosinhydroxylasou.

Aktuálnost experimentálních otázek, adekvátnost použitých metod a vědecká hodnota výsledků prošla již recenzním řízením tří uznávaných mezinárodních časopisů, takže o vynikající úrovni práce nemůže být pochyb. Celkově hodnotím práci jako vynikající.

Autor jasně prokázal schopnost samostatné tvůrčí vědecké práce. Proto doporučuji tuto práci k obhajobě a doporučuji aby uchazeči byl udělen titul PhD.

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

V Praze 5.1.2009

K předkládané práci mám několik otázek, které nijak nesnižují vysokou úroveň práce:

Sonda AEDANS je používána jednak jako akceptor při měření vzdáleností mezi jednotlivými částmi molekuly, ale v jiných experimentech i jako fluorescenční senzor změn vlastností mikrookolí. Nemohou se změny fluorescenčních vlastností vyvolaných změnami mikrookolí projevat jako porucha při měření intenzity přenosu energie a tím i vzdálenosti?

Střední doba života excitovaného stavu AEDANS navázaného na cysteiny FOXO4 proteinu jsou kratší než 20 ns. Zjištěné doby dohasínání anizotropie fluorescence jsou až 80 ns. Nesnižuje tento velký rozdíl přesnost měření?

Nebylo by výhodnější vynést grafy 2 publikace 2 v logaritmické škále koncentrací? Možná by lépe vynikly případné rozdíly.

Při studiu interakce 14-3-3 proteinu s regulační domény tyrosin hydroxylasy byly v tomto proteinu provedeny mutace vložím tryptofanu na několik míst namísto fenylalaninu. Existuje nějaká informace o tom, že tyto mutace neovlivňují strukturu proteinu (nebo jeho funkci)?