

Posudek na doktorskou disertační práci Jana Šilhána

'Studium molekulárních mechanismů funkce 14-3-3 proteinů'

Doktorská disertační práce RNDr. Jana Šilhána shrnuje výsledky studií zabývajících se funkcemi molekuly proteinu 14-3-3 a jeho interakcemi s dalšími molekulami, zejména se specificky se vázícími peptidy, transkripčním faktorem FOXO4 a tyrosine hydroxylázou.

Práce předkládá výsledky biofyzikálních a funkčních studií zmíněných proteinů uskutečněné v rámci dlouhodobého projektu studia proteinů 14-3-3 v laboratoři doc. Obšila. Úvodní kompilace a jednotlivé publikace uvedené v disertační práci ukazují, že předkladatel umí používat širokou škálu molekulárně biologických, biochemických a biofyzikálních metod a že umí jednotlivé výsledky zařadit do širšího kontextu.

Úvodní pasáž je napsána přehledně a ukazuje na porozumění tématu. Některé formulace by bylo možné stylisticky vybrousit, nejde ale v žádném případě o problémy s věcnou správností textu. Rovněž moje druhá poznámka, týkající se úvodu práce, nemíří na podstatu, ale spíše na formu. Nevím, zda jde o doporučení v rámci fakulty nebo studijního oboru, či iniciativu samotného autora, ale trochu mě překvapilo, že úvodní text je psán česky. Osobně si myslím, že u přírodovědného oboru je vhodnější, když se student naučí formulovat anglicky i delší a komplexnější text, prakticky celá jeho profesionální komunikace bude probíhat v angličtině.

Předkladatel prezentuje čtyři původní publikace, tři vyšlé, jedna byla zaslána k posouzení, u dvou prací (články I a II v tezích) je rovněž jejich první autor. Všechny tři publikované práce vyšly v kvalitních časopisech, dvě v Journal of Biological Chemistry, jedna v Biochemistry, kde byly oponovány světovými odborníky v oboru a jejich kvalita je prověřená. Práce zasláná k posouzení, kde je předkladatel první autor, je podle mého názoru velmi kvalitní, bohužel jsem v disertaci nenašel zmínku o tom, do jakého časopisu ji autoři zaslali, ale předpokládám, že jde rovněž o časopis na úrovni ostatních publikací.

Studium interakcí proteinů 14-3-3 s některými ligandy, například transkripčním faktorem FOXO a peptidovými fragmenty, které zastupují části serotonin N-acetyl transferasy, jsou aktuální úkoly a tyto molekulární systémy představují atraktivní cíl molekulárně biologických studií, výhledově i farmakologicky zaměřených studií. FOXO obsahuje 14-3-3 vazebnou doménu a jako transkripční faktor rovněž DNA vazebnou doménu a schopnost FOXO proteinu vázat dvoušroubovicovou DNA je pravděpodobně regulováno právě proteinem 14-3-3. Projekty prezentované v předkládané práci vyžadovaly použití moderních biofyzikálních a biochemických a molekulárně biologických metod. Předložená úvodní kompilace a hlavně jednotlivé publikace dokazují, že předkladatel tyto metody umí používat, rozumí jejich teoretickým základům a principům. Autor aktivně zvládl techniky exprese proteinů v prokaryotických systémech (zavádění His kotev, cílené mutace) u proteinů 14-3-3 i FOXO, značení proteinů fluorescenčními značkami, měření stacionární i časově rozlišené fluorescence (FRET), spekter cirkulárního dichroismu a jejich interpretací, i některých dovedností nutných pro difrakční stanovení molekulárních struktur, tedy hlavně krystalizaci, měření a rafinaci (upřesňování) krystalografických molekulárních modelů.

Na závěr si dovoluji několik konkrétnějších poznámek, dotazů a připomínek k jednotlivým publikacím.

Práce I. Kombinací časově rozlišené fluorescenční spektroskopie FRET a počítačových experimentů metodou molekulární dynamiky bylo získána určitá strukturní informace o velmi flexibilní C-terminální části proteinu 14-3-3. Ani krystalograficky ani technikami NMR spektroskopie se nepodařilo vyřešit 3D strukturu C-konce 14-3-3 za aminokyselinou 232 a ten je tak se vši pravděpodobností jak v pevné fázi tak v roztoku neuspořádaný, nebylo by možné získat dlejší nezávislé informace o dynamické struktuře některou z NMR spektroskopii? Další poznámka je

už čirá spekulace, možná by ale stála za určitou úvahu: C-koncová residua jsou mezi isoformami sekvenčně proměnlivá a jednotlivé sekvence jsou laděny na rozpoznání určitého proteinového ligandu. Při vazbě na rozpoznávanou molekulu je ale pravděpodobné, že se i tyto rozvolněné C-koncové části sbalí do definované struktury, kterou by bylo možné strukturně stanovit, ať už NMR nebo difrakčně.

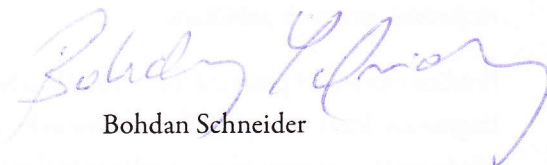
Publikace II. Jaká je povaha vazby proteinu 14-3-3 s transkripčním faktorem FOXO? Je dostatečně silná a stabilní na to, aby bylo realistické pokusit se krystalizovat komplex mezi jednou z izoform 14-3-3 (zřejmě ζ) s FOXO a vyřešit strukturu tohoto komplexu?

V práci je zmiňována nepublikovaná krystalová struktura komplexu mezi 14-3-3 a peptidovým fragmentem odvozeným z C-koncové části serotonin N-acetyl transferázy. Bude deponována? Je reálné krystalizovat 14-3-3 s jinými peptidovými sekvencemi a nebylo by možné pokusit se je prodloužit tak, aby reprezentovaly podstatnější část serotonin N-acetyl transferázy?

Publikace III. Transkripční faktory musí velmi selektivně rozpoznávat poměrně krátké DNA sekvence. 'Forehead responsive' (FRE) sekvence je podobná 'insulin responsive' (IRE) konsensus sekvenci. Byly měřeny termodynamické charakteristiky (vazebné konstanty, ΔH a ΔS , eventuálně kinetika vazeb) FRE a IRE sekvencí na FOXO a insulínem indukovaných transkripčních faktorů (např. PDX-1)? Jak by se měřit daly?

Závěrem rád konstatuji, že vzhledem k tomu, že předkladatel zvládl širokou škálu experimentálních metod molekulární biologie a biofyziky a objasnil hlavní rysy interakce FOXO s konsenzuální sekvencí DNA a některé aspekty regulace interakcí systému FOXO-DNA proteiny 14-3-3, je třeba předkládanou práci ocenit jako vynikající. Předkladatel prokázal schopnost tvůrčí práce a splňuje požadavky kladené na doktorskou disertační práci z oboru. Proto je možno shrnout, že na základě této práce doporučuji žádost RNDr. Jana Šilhána o titul Ph.D. ke kladnému vyřízení.

V Praze 28. prosince 2008



Bohdan Schneider