

Příloha 6: Posudek oponenta habilitační práce

Masarykova univerzita

Fakulta Přírodovědecká fakulta MU
Habilitační obor Molekulární biologie a genetika

Uchazeč Mgr. Jan Paleček, Dr. rer. nat.
Pracoviště Přírodovědecká fakulta MU a CEITEC-MU
Habilitační práce Úloha domén a jejich interakcí v aktivitách proteinových komplexů

Oponent Ing. Jiří Hašek, CSc.
Pracoviště Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.
Václavská 1083
142 20 Praha 4-Krč

Předložená habilitační práce Dr. Palečka má formu komentovaného souboru devíti přímo zahrnutých publikací a tří dalších relevantních prací. Práce se týká tří témat, kterými se Dr. Paleček postupně zabýval a jejichž společným prvkem je studium specifických proteinových domén.

První téma souvisí s disertační prací Dr. Palečka, která byla zaměřena na objasnění interakcí konzervovaného proteinu Sla2/HIP1. Tento protein patří mezi proteiny endocytického pláště a aktin-asociované proteiny důležité pro nukleaci aktinových mikrofilament. Jsou diskutovány dvě zahrnuté publikace. První práce (MBC) je věnována doménové analýze proteinu Sla2 ve vztahu k jeho funkci v endocytóze. Mezi jinými bylo zjištěno, že protein Sla2 tvoří homodimér a tato dimerizace je závislá na přítomnosti jeho centrální domény. Ve druhé práci (BBRC) Dr. Paleček zjistil, že tento s aktinem asociovaný protein fyzicky interaguje s proteinem Rpg1, který je podjednotkou translačního iniciačního faktoru eIF3. Při řešení tohoto tématu využíval metody kvasinkového dvojitého hybridu a koimunoprecipitace vytvořených proteinových variant. Prokázal, že protein Sla2 fyzicky interaguje s Rpg1 doménou kódovanou aminokyselinami 318-373. Tato interakce zřejmě přímo nesouvisí s úlohou Sla2 v endocytóze.

Ve druhé části habilitační práce se Dr. Paleček zabývá supresorovým proteinem p53 a jeho interakcemi. V první diskutované práci (BBRC) byla řešena otázka ovlivnění vazby proteinu p53 na DNA pomocí specifických monoklonálních protilátek. Autoři zjistili, že tyto MAb významně ovlivňují studovanou interakci a dokonce brání aktivaci p53. Některé z těchto testovaných protilátek dokonce způsobují uvolnění proteinu p53 ze specifického imunokomplexu. Technika analýzy změn posunu DNA fragmentů v gelu byla poté využita i v další začleněné publikaci (NAR), kdy byla studována úloha jednotlivých domén proteinu p53 ve vazbě celého proteinu ke scDNA. Na základě svých výsledků, autoři navrhli model, dle kterého jsou dva DNA duplexy propojeny do p53-scDNA vlákna. Problematiky ovlivnění interakcí proteinu p53 specifickými monoklonálními protilátkami se také týká třetí zahrnuté práce. Výsledky uvedené v této práci podporují hypotézu, že změny v topologii DNA mohou být součástí mechanismu řídicího přepínání mezi latentní a aktivní formou proteinu p53 po buněčném stresu.

Třetí část habilitační práce se týká projektu analýzy proteinových interakcí v rámci komplexu SMC (structure maintenance of chromosome). Jsou zde diskutovány výsledky čtyř publikací v prestižních zahraničních časopisech, které vznikly v rámci dlouhodobé zahraniční spolupráce Dr. Palečka. Začleněné publikace se týkají zejména proteinů smc proteinů

kvasinky *S. pombe*. Nejdříve se podařilo identifikovat dva proteinové subkomplexy smc proteinů propojené slabou interakcí mezi proteiny Nse2 a Nse3 (MCB). Další publikace přináší hlavní zjištění, že protein Nse2 je SUMO ligáza (MCB). V další publikaci, která je v časopise JBC a které je Dr. Paleček prvním autorem, autoři navrhli, že protein Nse4 a jeho orthology tvoří podrodinu tzv. delta-kleisinů, jejichž funkcí je provazovat hlavové domény smc proteinů. Jako poslední je v této části zahrnut rukopis práce o interakci Nse4 a Nse3 proteinů, kde je Dr. Paleček uveden jako jeden ze dvou korespondujících autorů, a který byl již zveřejněn v časopise Plos One (dle PubMed). Autoři ukázali nejen, že interakce proteinů Nse3 a Nse4 je zachovaná i u jejich lidských orthologů, ale i, že řada tzv. MAGE (melanoma associated antigen) proteinů je schopna reagovat nejenom s NSE4a a 4b, ale i s příbuznými proteiny EID rodiny (smc proteiny bez C-koncové WHD domény umožňující vazbu na SMC5 hlavovou doménu).

Dosažené výsledky jsou v poměrně obsáhlém komentovaném přehledu velmi dobře diskutovány i s ohledem na jejich využití v dalších analýzách. Všechny publikované práce autora (celkem 12 prací) jsou také citovány (401 citací podle WOS). O dobré kvalitě publikovaných výsledků svědčí i poslední zahrnutý článek autora zveřejněný v roce 2011 v časopise PLoS One, který byl dle WOS již jednou citován.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

- 1. Co je známo o významu dimerizaci proteinu Sla2?**
- 2. Existuje propojení proteinu p53 s aktinovým cytoskeletem?**
- 3. Která z metod průkazu protein-protein interakcí je dle Vašeho názoru nejvěrohodnější?**
- 4. Jaká jsou omezení "pulldown" průkazů protein-protein interakcí in vitro?**
- 5. Přílohou habilitační práce je rukopis odeslaný k recenzi do časopisu PLoS One v roce 2010. Okomentujte případné změny v revidované verzi publikace oproti rukopisu.**

Závěr

Mohu konstatovat, že výsledky práce Dr. Palečka, shrnuté v předloženém souboru publikací, mají velmi dobrou úroveň. Dr. Paleček prokázal schopnost řídit vědecký kolektiv a svým přístupem k řešení vědeckých problémů umožnil rozvoj i mladších vědeckých pracovníků. Habilitační práce Mgr. Jana Palečka, Dr. rer. nat. „Úloha domén a jejich interakcí v aktivitách proteinových komplexů“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Molekulární biologie a genetiky.

Praha, 11. listopadu 2011

