

Oponentský posudek doktorské disertační práce:

Mgr. Dalibor Košek:

Úloha protein-proteinových interakcí v regulaci signálních proteinů a enzymů

Předložená práce se zabývá tematikou, jejíž mimořádný význam je mimo diskusi. Je to však oblast velmi náročná po stránce experimentální, a zvláště pak pokud jde o interpretaci výsledků a o jejich začlenění do širších souvislostí. Disertace je zaměřena na studium interakcí protein-protein, tedy systémů, z nichž každý jednotlivý je složitý sám o sobě. Jejich vzájemná interakce je pak výslednicí působení celé řady faktorů. Budiž zde předesláno, že se autor zhostil tohoto úkolu velmi úspěšně.

Dokládá to ostatně jeho spoluautorství (na prvním nebo druhém místě mezi autory) tří publikací v renomovaném *Journal of Biological Chemistry*, o které se předložená práce především opírá. Její členění tuto skutečnost odráží, takže je tvořena dvěma hlavními celky – vlastním textem a Přílohou, kde jsou zmíněné tři publikace.

Pokud jde o text čítající 111 stran, je členěn klasicky, po úvodních abstraktech v češtině a v angličtině, na literární přehled, cíl práce, materiál a metody, načež následují výsledky (31 stran), diskuse (8 stran), závěr a obsáhlý seznam literatury. Zpracování je přehledné, systematické, jen se autor místy nevyvaroval překlepů, případně prohřešků proti gramatice. Je to však v míře únosné.

Studium se zaměřilo na několik proteinů, ASK1 (ASK - signal-regulating kinase 1), fosducin (Pdc) a Nth1 (Nth – neutrální trehalasa), přičemž partnery jim byly TRX (thioredoxin) a především pak jedna z variant proteinu 14-3-3, který je dlouhodobě studován v laboratoři autorova školitele. Dalším zkoumaným preparátem byl Bmh, kvasničný analog tohoto proteinu. Význam všech těchto bílkovin, jak se dočteme v přehledu literatury, je značný, takže je rozhodně na místě podrobně zkoumat jejich vlastnosti a vzájemné chování.

Práce na uvedené tématice byla v zásadě dvojího druhu. Především bylo třeba bílkoviny exprimovat, přečistit, případně modifikovat pro další práci, což byl úkol biochemický, kdy šlo mimo jiné o to připravit vhodné konstrukty, například domény ASK1, či různé modifikace proteinu 14-3-3, jako variantu bez C-koncového segmentu, apod. Rovněž byla někdy provedena cílená náhrada některé aminokyseliny. Po následující charakterisaci preparátu následovalo teprve vlastní zkoumání interakcí. K tomu posloužilo několik základních metod: časově rozlišené dohasínání intenzity a anisotropie fluorescence, malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS), analytická ultracentrifugace, které jsou v oddílu metod podrobně popsány. Naměřené hodnoty byly pak zpracovávány nejrůznějšími počítačovými programy.

Výsledkem práce byla řada podstatných závěrů týkajících se zkoumaných interakcí, ať již to bylo zjištění stechiometrie vzniklého komplexu (ASK1-CD s 14-3-3, kde to je 2:2), konstatování úlohy jednotlivé aminokyseliny v interakci (Trp31 v TRX1 účastníci se přímo vazby), nebo zjištění, která část proteinu hraje větší roli v interakci s partnerem (kde je to např. doména Pdc-ND). Z fluorescenčních dat a SAXS se podařilo navrhnout strukturní model komplexu TRX1 s ASK-TBD (jedné z domén této bílkoviny). Pokud jde o protein 14-3-3, pak významné bylo konstatování, že absence jeho C-koncové části zesiluje interakci s ASK1-CD (proto se pracovalo dále s modifikovanou formou 14-3-3 Δ C). To je pouze velmi stručný výčet některých závěrů vyplývajících z tohoto studia, který naznačuje šíři záběru autorova experimentování. Významné přitom je, že bylo zkoumáno hned několik systémů protein-protein, což je podstatné z hlediska shromažďování podkladů, které by snad časem mohly přispět hledání obecnějších zákonitostí těchto procesů.

Předchozí část tohoto posudku sdostatek naznačuje, že předložená práce je velmi kvalitní, a nemám k ní žádné zásadní připomínky. Následující body jsou spíše jen jejím doplněním, případně tématy pro diskusi:

1) Jen drobná poznámka – u zmínek o aniontové a kationtové chromatografii (str. 43) se uvádí, že se tato metoda opírá o hodnoty isoelektrického bodu. Možná mohly být tyto hodnoty uvedeny při popisu jednotlivých bílkovin.

2) Na str. 26, v popisce k obr. 5, je zmínka o predikci naznačující známky sekundární struktury v proteinu ASK1. Je to převzatý údaj; otázka je, o jakou techniku predikce šlo? Formulace „známky sekundární struktury“ je totiž poměrně opatrná.

3) Jak přesné je stanovení zdánlivé disociační konstanty proteinového komplexu pomocí analýzy sedimentačních isotherem v porovnání s jinými metodami (např. isothermální titrační kalorimetrie, nebo měření anisotropie fluorescence)?

4) Jak ovlivňuje solvatační sféra proteinů rozptyl rentgenového záření? Jak je tento problém brán v potaz při vyhodnocování rozptylových dat či při modelování teoretické rozptylové křivky SAXS na základě krystalové struktury? S tím souvisí základní problém, zda jsou alespoň nějaké představy o solvatačních sférách zkoumaných proteinů.

5) Na str. 73 se v souvislosti s komplexem ASK1-TBDC250S:TRX1 uvádí, že Trp31 v TRX1 interaguje s ASK1 „jiným způsobem“. Dá se, alespoň přibližně, usuzovat jakým?

6) Zajímavá je krátká studie s proteinem Bmh1 (kvasničným analogem proteinu 14-3-3), který je popsán jako aktivační element neutrální trehalasy 1 (Nth1). Míra aktivace totiž závisí mimo jiné na přítomnosti vápenatých iontů. Otázky jsou:

a) Jak daleko jde analogie mezi Bmh1 a 14-3-3?

b) Pokud je velká, nehrají pak i v chování 14-3-3 roli rovněž nějaké kationty?

Shrnutí – Mgr. Dalibor Košek předložil velmi kvalitní disertační práci, která svědčí o jeho experimentální i odborné zdatnosti. Shromážděné výsledky jsou základem, na který může navazovat další výzkum, tím spíše, že autor v práci místy přímo naznačil, kde by bylo vhodné pokračovat získané poznatky prohlubovat.

Závěr: předložená práce splňuje nároky na práci disertační a doporučuji ji po obhájení jako podklad k získání titulu Ph. D.

Prof. RNDr. Vladimír Karpenko, CSc.

Praha, 28. července 2015