

Posudek na disertační práci “Studium mechanismů regulace vybraných proteinkinás”  
Mgr. Olívie Petrvalské, 1. LF UK.

Mgr. Petrvalská se ve své disertační práci zabývala studiem molekulárních interakcí proteinkinás ASK1 a CaMKK2 a proteasy kaspasy-2 s různými isoformami regulačního proteinu 14-3-3 a v případě ASK-1 i s thioredoxinem.

Řešené téma považuji za vysoce aktuální a to nejen z hlediska získání nových poznatků základního významu o regulaci enzymů zapojených do signálních mechanismů buňky prostřednictvím reversibilní fosforylace proteinů či apoptosy. Použité metody a postupy shledávám dobře volené pro řešené úkoly a dobře se hodící na katedru fyzikální chemie PŘF UK.

Výsledky práce přinesly cenné nové poznatky o mechanismu deaktivace kinázy ASK-1 proteinem 14-3-3 $\xi$ , stechiometrii komplexu i přibližné struktuře komplexu. Dále byly získány nové poznatky o rolích disulfidických můstků při disociaci a tvorbě komplexu kinázy ASK-1 s thioredoxinem. Další experimenty vnesly nové světlo na strukturu komplexu kinázy CaMKK2 a proteinem 14-3-3 $\gamma$ , který má na kinasu mírně aktivační efekt. Nakonec byla identifikována relativně silná, sub-mikromolární vazba fosforylovaného proteinu 14-3-3 $\xi$  na prokaspasu-2 bránící tak aktivaci proteázy.

Po formální stránce byla disertační práce zpracována formou relativně krátkého obsahu doplněného o připojené publikace. Mgr. Petrvalská je první autorkou publikace v časopise J. Biol. Chem. a spoluautorkou publikací ve FEBS. J., v BBA a BBRC. Její podíly na publikacích jsou vysvětleny.

Celkově se domnívám, že práce představuje špičkový výzkum mezinárodního významu, což je dokumentováno několika příloženými publikacemi ve velmi kvalitních časopisech. Práce významnou měrou přispěla k rozvinutí poznání molekulárního mechanismu regulace kináz a kaspázy proteiny 14-3-3.

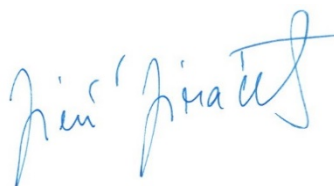
Disertační práce prokazuje předpoklady autorky k obhajobě titulu Ph.D. a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

Na závěr přikládám seznam několika dotazů týkajících se disertace a budu se těšit na jejich zodpovězení při obhajobě.

- Interakce proteinových partnerů byly studovány řadou sofistikovaných metod jako je metoda sedimentační rychlosti pomocí analytické centrifugace (SV AUC), malouhlovým rozptylem rentgenového záření (SAXS), <sup>31</sup>P-NMR, časově rozlišenou fluorescenční spektroskopií a diferenční skenovací fluorimetrií (DSF). Tyto metody ovšem poskytují pouze méně detailní či, mohu-li to říci, „méně přímé“ důkazy o charakteru proteinových komplexů. Proč nebyla za tímto účelem použita rentgenová krystalografie?
- V případě vyhodnocování výsledků SAXS analýz autorka uvádí, že byly prováděny *ab initio* výpočty molekulových obalů proteinů. Prováděla autorka tyto výpočty sama či někdo jiný?

- SV AUC analýzou byly zjištěna zdánlivá disociační konstanta komplexu fosforylovaného proteinu ASK-1 s proteinem 14-3-3 $\xi$  v hodnotě okolo 36  $\mu$ M. To je relativně slabší interakce. Jsou vnitrobuněčné koncentrace těchto proteinů dostatečně vysoké, aby tato interakce byla biologicky relevantní?
- *Ab initio* rekonstrukce tvaru molekulové obálky komplexu pASK1-KD:14-3-3 $\xi$  na základě SAXS dat naznačila, že dimery obou proteinů jsou vůči sobě uspořádány asymetricky, což je vzhledem k dvoučetné rotační symetrii obou proteinů opravdu překvapivé. Jak si to vysvětlujete? Není pozorovaná zdánlivá asymetrie komplexu spíše artefaktem (či pouze jednou u možných struktur) způsobeným vyšší flexibilitou komplexu?
- V případě thioredoxinu bylo zkoumáno pět cysteinů potenciálně zapojených do interakce s ASK1-TBD. Výsledky ukázaly, že vyšší vazebné afinitě prospívá prostředí redukční, zatímco oxidační podmínky afinitu snižují. Je známo v jaké formě tyto cysteiny v nativním thioredoxinu jsou? Tvoří mezi sebou disulfidické můstky či jsou ve formě redukované?

V Praze, 20. srpna 2018, Jiří Jiráček



Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic, tel.: +420 220 183 441, fax: +420 220183571  
e-mail: [jiracek@uochb.cas.cz](mailto:jiracek@uochb.cas.cz), <http://www.uochb.cz/web/structure/184.html>