

## **Studium mechanismů regulace vybraných proteinkinás**

*Školící pracoviště:* Katedra fyzikální a makromolekulární chemie,

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

*Obor:* Fyzikální chemie

*Školitel:* prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

*Téma a aktuálnost práce.* Doktorská disertační práce Mgr. Olivie Petrvaldské se zabývá regulačními mechanismy proteinu 14-3-3 (isoformem  $\zeta$  a  $\gamma$ ), konkrétně aktivací signální kinázy ASK1, regulace kinázy CaMKK2 a kaspasy-2. Jednotícím prvkem práce je tedy dlouhodobé soustředění laboratoře prof. Obšila na protein 14-3-3.

Řešená problematika je důležitá a aktuální jak pro pochopení obecnějších pravidel regulace buněčného cyklu, tak potenciálně pro jejich regulaci v léčebných zásazích. Isoformy proteinu 14-3-3 jsou v jádru řady složitých regulačních mechanismů, jejichž molekulární mechanismy je obtížné pochopit bez stále chybějící strukturní informace, kterou se předložená práce snaží získat.

*Zpracování, cíle a výsledky práce.* Po stránce formální má disertační práce vysokou úroveň. Autorka pro práci zvolila tradiční verzi plynulého textu, nikoli zkrácenou formu komentující publikované výsledky. Výsledný text je ale podle publikací členěn a odvolává se na ně, včetně diskuze výsledků a závěrů. Krátká verze práce, která by komentovala výsledky získané v jednotlivých publikacích, mohla být přehlednější a autorka se mohla soustředit na zdůraznění skutečně důležitých pozorování a jejich širší diskusi. Práce je dobře dokumentovaná, na více než 100 stranách (plus přílohy) je citováno přes 150 referencí. Členění disertační práce je tradiční (úvod, doplněný přehledem literatury, cíle, metody, výsledky, diskuze, závěry, literatura) a dobře odráží diskutovaná témata. Práce je podložena čtyřmi publikacemi, jichž je Mgr. Petrvaldská spoluautorkou, dvě publikace jsou prvoautorské.

V úvodu jsou popsány funkce studovaných proteinů v signalizaci, důraz je kladen na strukturní charakterizaci dostupných komplexů.

Cíle jsou velmi podrobně rozepsané do čtyř bodů. Přehlednosti práce by prospěla reference na kapitolu ve výsledkové sekci, kde lze diskuzi na dané téma dohledat.

Použité metody jsou vysvětleny dostatečně podrobně. Na 18 stranách popisují provedené experimenty a zahrnují protokoly exprese a purifikace studovaných proteinů a popisy celé škály biochemických a biofyzikálních metod charakterizace proteinů a jejich komplexů (analytická centrifugace, měření katalytické aktivity pomocí  $^{32}\text{P}$ , SAXS, NMR využívající signálu  $^{31}\text{P}$ , časově rozlišená fluorescenční spektroskopie, diferenční skenovací fluorimetrie).

Ve výsledkové části autorka nejvíce pozornosti věnuje popisu výsledků, na jejichž získání se osobně podílela. Získané výsledky jsou podrobně popsány, použité biochemické a biofyzikální techniky poskytují pohled na komplikované regulační mechanismy signalizačních drah.

### *Poznámky a otázky.*

Expresce proteinů byla prováděna v *E. coli*. Pokud mají potenciální glykosylační místa, je jejich glykosylace funkčně nevýznamná?

Model komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta$ /pCaMKK2 na obrázku 5.13 ukazuje silně asymetrickou vazbu jednoho CaMMK2 mimo 14-3-3 kolébkovité vazebné místo. Je příčinou přednostní vazba jiného partnera do hlavního vazebného místa 14-3-3? Máte nějaké vysvětlení pro asymetrii vazby, jakou by byla např. rozdílná struktura monomerů dimeru 14-3-3? Byla relevance SAXS dat kontrolována jinými metodami?

V kapitole 5.2 se diskutuje role disulfidických můstků v interakci thioredoxinu s vazebnou doménou ASK1. Zmiňujete, že tvorba disulfidického můstku mezi Cys62 a Cys69 TRX1, které jsou od sebe původně 17 Å, musí indukovat strukturní změny v proteinu TRX1. Přitom vazebná konstanta pro disociaci komplexu TRX1 — ASK1-TBD se pro oxidovaný a neoxidovaný stav mění málo (str. 75). Máte pro toto pozorování vysvětlení?

*Závěr.* Disertační práce přináší originální poznatky a ukazuje na autorčinu schopnost multidisciplinárního přístupu k výzkumu, který je pro řadu biologických problematik zásadní. Mgr. Olivie Petrvaldská prokázala předpoklady k samostatné tvůrčí vědecké práci, doporučuji proto oborové radě doktorského studijního programu práci přijmout v předložené formě jako podklad pro udělení titulu „PhD“ za jménem.

V Praze 20. srpna 2018

Bohdan Schneider