



**ÚOCHB** AV  
ČR  
**IOCB PRAGUE**

Ústav organické chemie a biochemie  
Akademie věd České republiky, v. v. i.  
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry  
of the Czech Academy of Sciences

RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.

[zakova@uochb.cas.cz](mailto:zakova@uochb.cas.cz)

Tel. +420 220 183 441

## **Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Pavla Pohla**

### **„Vliv proteinu 14-3-3 na intradoménové interakce ubiquitin ligasy Nedd4-2“**

Hlavním cílem doktorské disertační práce Mgr. Pavla Pohla byla příprava konstruktů proteinu Nedd4-2 a proteinů 14-3-3, studium jejich interakcí a strukturní charakterizace konstruktů lidské ubiquitin ligasy Nedd4-2<sup>335-455</sup> s proteinem 14-3-3 $\eta$ . Proteiny 14-3-3 se vyskytují v eukaryotním systému v mnoha různých isoformách, zúčastňují se mnoha klíčových fyziologických pochodů a počet jejich interakčních partnerů je v současné době více než 1200. U vazebných partnerů vyžadují proteiny 14-3-3 fosforylaci konkrétních aminokyselin a absence fosforylace může ovlivnit jejich vzájemnou vazebnou afinitu. Ligasa Nedd4-2 ze skupiny HECT ligáz ubikvitinuje široké spektrum membránových proteinů a receptorů a hraje tak klíčovou roli v udržení homeostáze organismu. Interakce Nedd4-2 s proteiny 14-3-3 ovlivňuje následnou schopnost proteinu Ned4-2 interagovat s dalšími substráty.

Práce Pavla Pohla směřovala na biofyzikální charakterizaci proteinu Nedd4-2 a jeho komplexu s proteiny 14-3-3 a poskytnutí tak strukturního náhledu do mechanismů regulace této ubiquitin ligasy. Práce zahrnuje význam jednotlivých fosforylačních míst na proteinu Nedd4-2 v síle interakce a mapuje strukturní změny tohoto proteinu po jeho interakci s proteiny 14-3-3. Hlavními experimentálními přístupy byly exprese a purifikace proteinů, cílená bodová mutagenese, měření polarizace fluorescence, analytická ultracentrifugace, krystalografie, malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) a *in silico* modelování. Nejvýznamnějším výsledkem Pavla Pohla v této disertační práci je struktura komplexu konstruktů proteinu Nedd4<sup>335-455</sup>T367A s proteinem 14-3-3 $\eta$  $\Delta$ C, jež společně se strukturní charakterizací SAXS metodou komplexu proteinu Nedd4-2<sup>186-975</sup> s proteinem 14-3-3 $\eta$  umožnila sestavit strukturní model ilustrující změny na proteinu Nedd4-2 po interakci s 14-3-3 $\eta$ . Tyto výsledky jsou součástí autorovi prvoautorské publikace.

Práce je psána v plné formě v českém jazyce, má standardní členění. V teoretickém úvodu se autor věnuje připravovaným proteinům, jejich funkcí a významem. Následují cíle disertační práce a rozsáhlá kapitola Experimentálních metod, která je z mého pohledu velmi pěkně a srozumitelně sepsaná i s principy jednotlivých metod. Výsledková část zahrnuje exprese a purifikace jednotlivých proteinů a výsledky z jednotlivých metod. Následuje Diskuse a Závěr. O autorově dobrém přehledu v problematice svědčí velké množství citované literatury. Práce zahrnuje dvě publikace v recenzovaných vědeckých impaktovaných časopisech, prvoautorská publikace v *Communications Biology* (IF 6.548) a druhoautorská publikace v časopise *Biophysical Journal* (4.033). Práce jsou uvedeny v příloze. Práce obsahuje malé množství překlepů, zejména v metodické a výsledkové části, nicméně z formálního hlediska je v pořádku. Předložená disertační práce jasně ukazuje, že Mgr.Pavel Pohl získal značné zkušenosti a plně se orientuje ve svém oboru.

K práci mám následující otázky:

1. V práci je uvedeno, že jedním z regulačních mechanismů ubikvitinace proteinem Nedd4-2 je jeho fosforylace na určitých fosforylačních místech. Mohl by autor rozvést i další regulační mechanismy?
2. Několikrát se v disertační práci zmiňuje oligomerizace proteinu Nedd4-2. Mohl by autor uvést jaký je pravděpodobný fyziologický význam oligomerizace a jestli je možné oligomerizaci regulovat?
3. Autorovi se nepodařilo připravit plně dlouhý protein Nedd4-2 v *E.coli*. Domníváte se, že změna expresního systému na eukaryotní by mohla vést k úspěšné přípravě celého proteinu?
4. Pokud by se podařilo připravit komplex proteinu 14-3-3 s nějakým větším konstruktem proteinu Nedd4-2 neuvažujete o určení struktury takového komplexu metodou cryo-EM vzhledem k velkému množství flexibilních částí „nevýhodných“ při proteinové krystalografii?

Předkládaná disertační práce **splňuje** požadavky na disertační práci. Autor prokázal vědeckou erudici, tvůrčí potenciál a je schopen samostatné výzkumné činnosti a práce představuje cenný přínos k problematice regulace proteinu Nedd4-2 prostřednictvím proteinů 14-3-3.

Jelikož předložená práce Mgr. Pavla Pohla vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně **doporučuji** její přijetí k obhajobě.

V Praze 30. listopadu 2022

RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.