

Oponentský posudek disertační práce
Pavel Pohl: Vliv proteinu 14-3-3 na intradomenové interakce
ubikvitin ligasy Nedd4-2

Disertační práce Pavla Pohla byla vypracována na Fyziologickém ústavu AV ČR, v Laboratoři strukturní biologie signálních proteinů, pod vedením vedoucí této laboratoře, RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D. Tématem práce byl výzkum interakce proteinu 14-3-3 a ubikvitin ligasy Nedd4-2, s využitím řady pokročilých technik strukturní biologie. Předložená práce má 143 stran a její přílohou jsou dvě publikace ve kvalitních mezinárodních časopisech. Na jedné z nich je Pavel Pohl uveden na prvním místě a jeho podíl na této publikaci je zcela zásadní.

Předložená práce je psána a členěna klasickým způsobem. Teoretický úvod je dobrým uvedením do problematiky ubikvitinylace a její regulace v buňce. Text úvodu představuje zajímavou a svěží četbu, ze které je patrný dobrý přehled autora o popisované problematice. Po tomto oddílu následuje vytčení deseti cílů práce a podrobný popis použitých metodik. Řada z nich se týkala exprese a purifikace jednotlivých proteinových konstruktů, další potom vlastních biofyzikálně chemických metod výzkumu proteinových interakcí. Práce pokračuje oddílem Výsledky a je zakončena Diskusí a Závěrem, ve kterém je vyjádřeno naplnění původně stanovených cílů práce.

K práci mám následující poznámky a připomínky:

- 1) Příprava materiálu pro vlastní experimenty může někdy představovat sice časově zdlouhavé, ale přece jen nekomplikované opakování zavedených pracovních protokolů. Zde byla součástí přípravy naopak řada náročných optimalizací, bez nichž by exprese a purifikace multidomenových konstruktů proteinu Nedd4-2 nebyla vůbec myslitelná.
- 2) Přestože studium interakce dvou proteinů zní jako dobře definovaný úkol, situace, do které se musel kandidát při svém výzkumu ponořit, je daleko složitější, než by se mohlo na první pohled jevit. Protein 14-3-3 má množství isoform, protein Nedd4-2 má mnoho různě fosforylovaných variant, přičemž všechny tyto aspekty mají důležitý strukturní a nepochybně i funkční význam. Je myslím důležité podotknout, že při své práci kandidát studoval celý problém skutečně v této široké komplexitě a nezjednodušil si ho na počátku zaměřením na pouze jednu variantu ze všech kombinací.

- 3) Jako nejdůležitější výsledek práce vnímám vyřešení krystalové struktury komplexu 14-3-3 a zkrácené varianty proteinu Nedd4-2. Existuje relativně velké množství struktur 14-3-3 proteinů s jednotlivými navázanými peptidy, ale struktury s celými navázanými proteinovými doménami jako tato, jsou stále velmi vzácné.
- 4) Použitá šíře experimentů a množství zkoumaných proteinových konstruktů je tak rozsáhlé, že se v posudku nelze věnovat všem aspektům výzkumu. Zvláště bych ale rád vyzdvihnul vytvoření modelu interakce obou proteinů pomocí molekulárního modelování s využitím výsledků několika strukturně biologických technik najednou (SAXS, difrakční analýza krystalů, chemické zesíťení spojené s hmotnostní spektrometrií). Pozoruhodné jsou především efekty, které má navázání proteinu 14-3-3 na vzájemnou interakci domén Nedd4-2. Tyto změny mají nepochybně funkční význam a mohou mít např. souvislost s autoinhibicí této ubikvitin ligasy.
- 5) Práce je i po formální stránce velmi kvalitní a vytknout jí lze jen málo věcí. Jen pro úplnost uvádím občasné překlepy, či obtížněji čitelný popis na některých obrázcích. Součástí výsledků by si podle mého názoru zasloužila být i tabulka shrnující výsledky měření difrakčních dat na krystalech a výsledky následné rafinace struktur. (Přiložená kopie publikace ovšem tuto tabulku obsahuje.)

K práci mám tyto dotazy:

1. Eluční pík z gelové permeační chromatografie na str. 80 není symetrický. Je to způsobeno částečnou dimerizací proteinu 14-3-3?
2. Šlo by lépe objasnit technický postup eluce na niklové koloně popisovaný na str. 83?
3. Pokud je v práci zmiňováno, že protein Nedd4-2 v jeho plné délce nebylo možno rekombinantní připravit, byly testovány i některé eukaryotické expresní systémy?
4. Existují důvody k domněnce (např. z predikce 14-3-3 vazebných míst), že by doména C2 proteinu Nedd4-2 mohla nějakým způsobem interagovat s 14-3-3 proteinem v rámci celého komplexu?

5. Umožňuje vytvořený model interakce obou proteinů nějaké nové testovatelné strukturní či funkční predikce?

Na závěr bych chtěl dodat, že předkládaná práce dle mého názoru výborně splňuje nároky na ni kladené, plně prokazuje předpoklady autora k samostatné vědecké práci a doporučuji proto jejímu autorovi udělit titul Ph.D.

V Praze 1. 12. 2022

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.