

Oponentský posudek disertační práce **Karolína Honzejková: Strukturní studie vybraných proteinových komplexů** **účastnících se přenosu signálu v buňce**

Dizertační práce Mgr. Karolíny Honzejkové se zabývá studiem několika vybraných proteinových komplexů různými metodami biochemie a biofyzikální chemie. Jednotčím prvkem těchto studií je význam daných komplexů pro přenos signálu v buňce a dále skutečnost, že proteiny těchto komplexů jsou ve všech případech fyziologickými partnery pro vazbu s 14-3-3 proteiny. Konkrétně byl v rámci disertační práce studován komplex N-koncové části kinázy ASK1 s thioredoxinem, komplexy kináz CaMKK1 a CaMKK2 s proteinem 14-3-3 γ a komplex jaderného receptoru ER α s proteinem 14-3-3 ζ .

Ke své práci použila kandidátka celou řadu postupů a metod sahajících od exprese a purifikace jednotlivých proteinových konstruktů až k analytické ultracentrifugaci, vodík/deuteriové výměně ve spojení s hmotnostní spektrometrií, malouhlovému rozptylu rentgenového záření a kryoelektronové mikroskopii. Zde je na místě upozornit na to, že se jedná o úctyhodně široké spektrum metod, a hlavně na skutečnost, že se jedná o ty nejpokročilejší metody, které jsou v současné době ke studiu proteinových komplexů užívány. Lze tedy konstatovat, že dostupnost metod nebyla limitujícím faktorem této práce, což je velmi potěšující, a ne zcela obvyklé.

Předložená práce má 108 stran a je členěna obvyklým způsobem. Psána je dobrou angličtinou s minimem chyb a její přílohou jsou 2 články publikované a jeden článek doposud v recenzním řízení. Na jedné z publikací je kandidátka první autorkou. Podíl kandidátky na jednotlivých publikacích je vždy detailně a srozumitelně popsán. Kromě toho je kandidátka ještě spoluautorkou jedné další publikace s podobnou tematikou, která ovšem v této dizertaci zahrnuta není. Práce byla úspěšně kontrolována několika nezávislými programy a není plagiátem.

Výsledkem práce je řada detailních poznatků ohledně struktury studovaných proteinových komplexů, z nichž řada má významný dopad i na porozumění jejich funkci. Zvláště bych ale chtěl zdůraznit, že v průběhu práce na této dizertaci došlo k vyřešení struktury N-terminální části molekuly ASK1 metodou kryoelektronové mikroskopie. Získaná struktura dobře objasňuje způsob, jakým je tato multidoménná molekula schopna v roztoku tvořit asymetrický a kompaktní dimer a osvětluje vzájemné interakce, které mezi jednotlivými doménami dimeru existují. Znalost této struktury je zároveň důležitou vstupní bránou ke studiu dalších interakcí celého proteinu a k detailnějšímu pochopení funkcí této významné kinázy. Vyřešení struktury ASK1 považuji tedy za klíčový a nejdůležitější výsledek celé disertační práce, aniž bych chtěl snižovat důležitost a zajímavost mnoha dalších dílčích zjištění.

K práci mám pouze jednu poznámku: Na str. 5 je v české podobě abstraktu použit výraz „prostřednictvím svého N-lóbu“. Asi bych spíše doporučil použití termínu „N-koncové části“, či „N-koncového laloku“.

Rád bych ohledně práce položil kandidátce následující dotazy:

1. Na str. 59 ukazujete eluční profil z gelové permeační chromatografie užitý pro purifikaci konstruktů ASK1-TBD. Zdá se mi, jako by naznačoval přítomnost dimerů, snad i tetramerů a oligomerů současně s monomerem. Podle výsledků AUC to však vypadá, že tento konstrukt existuje pouze jako monomer. Bylo by možné se k tomu vyjádřit?
2. Při studiu ASK1 by se nabízelo zkusit vyřešit kryoelektronovou mikroskopií přímo strukturu jeho komplexu s thio-redoxinem. Byl takový experiment podniknut?
3. Lze spekulovat o tom, co představovalo při řešení struktury ASK1 kryoelektronovou mikroskopií limitující faktor pro její rozlišení?
4. Při srovnávání interakce CaMKK1 a CaMKK2 s proteinem 14-3-3 γ byla snaha objasnit, proč se oba komplexy chovají odlišně. Šlo by na základě srovnání sekvencí uvažovat, které chování CaMKK vůči 14-3-3 proteinu je zde evolučně původnější a které je teprve sekundárně získané?
5. Při studiu interakce ER α s proteinem 14-3-3 ζ nebyl v této práci pozorován žádný rozdíl mezi přirozeným proteinem a mutovanou formou ER α . Šlo by podle Vašeho názoru spekulovat o tom, že tomu tak nemusí být pro jiné izoformy 14-3-3 proteinu?

Na závěr bych chtěl vyjádřit svoje přesvědčení, že předložená práce splňuje všechny požadované podmínky, považuji ji za neobyčejně kvalitní, doporučuji ji přijmout k dalšímu řízení a kandidátce doporučuji udělit titul Ph. D.

V Praze 6. 2. 2024

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.