



**FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR**

**RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.**  
**Laboratoř Strukturní biologie signálních proteinů**  
**Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.**  
**detašované pracoviště BIOCEV**  
**Průmyslová 595**  
**25250 Vestec**  
**Tel.: +420 325873513**  
**Email: veronika.obsilova@fgu.cas.cz**

**Posudek školitelky na diplomovou práci Bc. Andreje Tekela**  
**“Structural insights into 14-3-3 dependent regulation of ubiquitin ligase Nedd4-2”**

Diplomová práce Bc. Andreje Tekela je součástí projektu zaměřeného na studium struktury komplexu lidské ubikvitinligasy Nedd4-2 s proteinem 14-3-3. Nedd4-2 je ubikvitinligasa klíčovým regulátorem homeostázy  $\text{Na}^+$ , protože ubikvitinuje různé kanály a membránové transportéry. Proteiny 14-3-3 a vápenaté kationty modulují interakce Nedd4-2, nicméně mnoho otázek týkající se strukturní podstaty této regulace zůstává nejasných díky zejména absenci experimentálních struktur.

Hlavním cílem diplomové práce Bc. Andreje Tekela byla exprese a purifikace proteinů Nedd4-2 a 14-3-3, charakterizace vlastností Nedd4-2 a komplexu Nedd4-2:14-3-3 $\eta$  v roztoku za přítomnosti a nepřítomnosti vápníku pomocí malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS). Pro tento účel byly vzorky měřeny přímo při průchodu kolonou během gelové filtrace (SEC-SAXS) na EMBL v Hamburku. Andrej obdržel data z SEC-SAXS měření zpracoval, porovnal vlastnosti jednotlivých vzorků pomocí bezrozměrného Kratkyho výnosu. Na základě dat získaných z Cryo-EM a SAXS pak následně namodeloval strukturu celého Nedd4-2:14-3-3 komplexu pomocí CORALu a obálku pomocí programu DENSS. Zde se zejména jednalo o celou neznámou oblast Nedd4-2 mezi aminokyselinami 259 a 526, která obsahuje jednak obě fosforylační místa pro vazbu proteinu 14-3-3, ale také WW2 a WW3 domény. V neposlední řadě pak Andrej porovnal vlastnosti samotného Nedd4-2 a fosforylovaného Nedd4-2 v závislosti na  $\text{Ca}^{2+}$  pomocí analytické ultracentrifugace.

Diplomová práce Bc. Andreje Tekela představuje důležitý krok v našem projektu a jeho výsledky budou zahrnuty v aktuálně připravované publikace. Andrej se během práce na své diplomové práci stal důležitou součástí naší laboratoře a na svém projektu pracoval s velkým zájmem a entusiasmem. Rychle a dokonale zvládl celé spektrum metod zpracování SAXS dat, modelování struktury proteinů, ale i expresi rekombinantních proteinů v bakteriálním expresním systému, purifikaci proteinů a metody molekulární biologie. Ukázal, že dokáže pracovat velmi pečlivě a samostatně. Kromě práce na své diplomové práci se účastnil i řešení dalších projektů naší skupiny.

Myslím si proto, že diplomová práce Bc. Andreje Tekela naprosto splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě a klasifikovat ji známkou výborně.

Ve Vestci 6. 5. 2024

RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.