



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

Tel. +420 220 183 441

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Dany Kalábové

„Molekulární mechanismus regulace funkce kaspasy-2 pomocí proteinů 14-3-3“

Hlavním cílem doktorské disertační práce Mgr. Dany Kalábové porozumět molekulárnímu mechanismu inhibice lidské kaspasy-2 prostřednictvím proteinu 14-3-3. K tomuto cíli bylo potřeba připravit stabilní a solubilní formy prokaspasy-2, jejích mutantů a její fosforylované formy. Dále pak charakterizovat interakci mezi fosforylovanou prokaspasou-2 s proteinem 14-3-3, identifikovat fosforylační místa v prokaspase-2 a sledování strukturních změn v obou molekulách při jejich interakci a krystalizace proteinu 14-3-3 s částí prokaspasy-2.

Práce poskytuje strukturní náhled do mechanismu inhibice a aktivace prokaspasy-2 interakcí s proteiny 14-3-3 a fosforylací proteinem kalcium/kalmodulin dependentní protein kinasy 2 (CaMKK2). Hlavními experimentálními přístupy byly exprese a purifikace proteinů, cílená bodová mutagenese, analytická ultracentrifugace, krystalografie, malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) a jiné. Nejvýznačnějším výsledkem disertační práce Dany Kalábové je práce o významu fosforylace dvou vazebných míst, Ser139 a Ser164 pro vazbu proteinu 14-3-3 na prokaspasu-2, kde se podařilo i získat krystalovou strukturu tohoto komplexu. Tyto výsledky jsou součástí autorčiny prvoautorské publikace.

Práce je psána v českém jazyce, má standardní členění. V teoretickém úvodu se autorka věnuje apoptose, významu jednotlivých připravovaných proteinů v tomto ději a také těmto proteinům samotným. Následují cíle disertační práce a skvělá 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 autorčině dobrém přehledu v problematice svědčí velké množství citované literatury. Práce zahrnuje čtyři publikace v recenzovaných vědeckých impaktovaných časopisech, prvoautorská publikace

v Biochemical and Biophysical Research Communications (IF 3.1), dále dvě sdílené prvoautorské publikace ve FEBS Journal (IF 5.4) a jedna spoluautorská publikace. Autorka ve výčtu svých publikací ještě uvádí jednu spoluautorskou publikaci, která není součástí disertační práce, ale je tématem velmi blízká. Práce jsou uvedeny v příloze. Práce je velmi pečlivě sepsaná, téměř bez překlepů, občas se vyskytnou drobné slovní neobratnosti nebo slangové výrazy (například skrz, nadužívání slova pomocí apod), nicméně po formální stránce je práce naprosto v pořádku, a i překračuje běžnou formální úroveň. Předložená disertační práce jasně ukazuje, že Mgr. Dana Kalábová získala značné zkušenosti a plně se orientuje ve svém oboru.

K práci mám následující otázky:

1. V úvodu se autorka zmiňuje, že je dimer molekuly kaspasy-2 velmi kompaktní a aktivní místo je tvořené úzkým a uzavřeným žlábkem a stabilizující disulfidický můstek je nepřístupný redukčním činidlům. Jakým způsobem lze tento dimer narušit?
2. Autorka připravovala několik mutantních konstruktů prokaspasy-2, které obsahovaly bodové mutace za tryptofan, které se poté používaly v metodách využívajících fluorescenci. Mohla by autorka říci, jak se určilo, na kterých místech se použije bodová mutace a jak se lišily výsledky z jednotlivých mutací?
3. Autorka píše, že komplex prokaspasy-2 a proteinu 14-3-3 spolu interagují nejen přes dvě vazebná fosforylační místa, ale i ostatními částmi obou molekul. Myslíte si, že krystalová struktura komplexu zkrácené formy proteinu 14-3-3 s pouze 34 aminokyselinovou částí prokaspasy-2 je dostatečná pro celkový obraz interakce prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3?
4. Plánujete připravovat i nějaký větší konstrukt proteinu 14-3-3 včetně jeho flexibilních částí v komplexu s větší částí prokaspasy-2? A využít k tomu i jiné metody než krystalografii, jako je například cryo-EM?

Předkládaná disertační práce **splňuje** požadavky na disertační práci. Autorka prokázala vědeckou erudici, tvůrčí potenciál a je schopna samostatné výzkumné činnosti a práce představuje cenný přínos k problematice regulace prokaspasy-2 prostřednictvím proteinů 14-3-3.

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

V Praze 19. prosince 2023

RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.