

Posudek na dizertační práci „**Studium faktorů ovlivňujících vazebnou specifitu 14-3-3 proteinů**“

Předkladatelka: Mgr. Dana Veisová

Školitelka: RNDr. Veronika Obšilová, PhD

Předkládaná dizertační práce je založena na dvou rukopisech přijatých v renomovaných impaktovaných časopisech (*Biochemistry; Biochemical journal*), kde je kandidátka prvním autorem. Členění předkládané práce tak logicky „kopíruje“ obsah jednotlivých publikací – první část je zaměřena na charakterizaci funkce a struktury C-koncového segmentu kvasinkových proteinů Bmh; navazující část poté popisuje vliv interakcí Bmh proteinů na aktivitu neutrální trehalasy I (Nth1). Proteiny Bmh jsou kvasinkové homology lidských protein 14-3-3, které hrají důležitou roli v řadě biologických procesů včetně přenosu signálů, diferenciace a proliferace, regulace buněčného cyklu, apoptózy a podobně. Toto téma je tedy aktuální a získané informace bezesporu jsou a budou přínosné pro širší vědeckou komunitu.

Zásadní zjištění předkládané práce jsou:

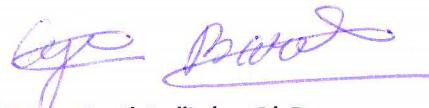
- C-koncový segment proteinů Bmh zaujímá nataženou konformaci, která pravděpodobně brání jeho „složení“ do vazebného žlábků a neplní tudíž funkci autoinhibitoru, jak je tomu u lidského orthologu.
- Pro vazbu proteinů Bmh jsou esenciální fosforylační místa Ser60 a Ser83 Nth1 nacházející se na neuspořádaném N-koncovém segmentu molekuly.

Při studiu Bmh proteinů se kandidátka zaměřila na využití biofyzikálních technik, které umožňují mapovat konformaci protein a protein-proteinové interakce a předložená dizertační práce dokumentuje široký rozsah těchto technik, které si kandidátka během svého doktorandského studia osvojila. Tyto zahrnují metody molekulární biologie (klonování, exprese a mutageneze), purifikaci a kinetickou charakterizaci rekombinantních proteinů, jakož i fyzikálně-chemické metody (nejrůznější fluorescenční techniky, analytická ultracentrifugace, hmotnostní spektrometrie).

Experimentální postupy, získaná data i jejich interpretace již prošly recenzním řízením v mezinárodních časopisech což zjednoduší oponenturu, jelikož by bylo zbytečné znova detailně analyzovat data přijatá vědeckou komunitou. Rád bych nicméně kandidátce položil několik „technických“ dotazů týkajících se jednotlivých experimentů, jakož i vztahu experimentálních dat a teoretických výpočtů:

1. Tabulka 33, strana 104 – disociační konstanty pro jednotlivé mutanty ukazují, že pro interkaci s Bmh jsou důležité pozice S60 a S83. Fosforylace na každém z těchto serinů zvyšuje afinitu k Bmh přibližně 50x násobně. Existuje nějaké strukturní vysvětlení, proč tento efekt není aditivní, t.j. proč mutant nesoucí oba seriny (pS60 + 80) nemá vyšší afinitu než mutanty pouze s jedním serinovým zbytkem?
2. Obrázek 30, strana 105 – z obrázku vyplývá, že fosforylace na pozicích S20 a S21 jsou v kontextu fosforylací S60 a S83 „inhibiční“ (t.j. mutant fosforylované současně na pozicích S20/21 a S60/83 mají nižší specifickou aktivitu než mutanty pS63 nebo pS80). Překvapivě, tento trend není zachován u wt enzymu (ve srovnání s mutantou S60+83). Je možné spekulovat, co může být příčinou těchto rozdílů?
3. Tabulka 18, strana 67 – pro PCR ověřování klonů jsou používány primery ve výsledných koncentracích 200 µM, což je minimálně 100x vyšší koncentrace než je obvyklé. Proč jsou používány tak vysoké koncentrace primerů?
4. Tabulka 29, strana 86 – vypočítané hodnoty měřené metodami sedimentační rychlosti/rovnováhy se shodují s teroreckými hodnotami vypočítanými z aminokyselinové sekvence (což je samozřejmě pozitivní). Při výpočtu byla podle autorky použita „metoda nejmenších čtverců pro model uvažující ideální látku“. Jak je definována „ideální látka“ pro výpočet? Z předchozích tvrzení/experimentů jsem získal pocit, že BMH1 wt nemá právě „ideální“ tvar?
5. Strana 76 – pro narostlou kulturu *kvasinek* jsou udávány dvě výrazně odlišné hodnoty absorbance při 600 nm – 0,6 (Spekol211) a 2,0 (BioPhotometer). Co znamená tento rozdíl – je způsoben rozdílnou optickou dráhou v kyvetě? Je-li tomu tak, pak by tyto informace měly být uvedeny v metodice!
6. Strana 47 – jak jsou definovány „aminokyselinové zbytky s vysokou elektronovou hustotou“? V čem je elektronová hustota histidinů vyšší než u jiných aminokyselin?
7. Strana 84 – Je možné nějak definovat vztah mezi hydrodynamickými poloměry protein získanými z měření DLS (SV) a z rentgenostrukturální analýzy. Například naměřené hodnoty pro 14-3-3zeta (DLS) je hydrodynamický poloměr z DLS přibližně 37 Å, z krystalové struktury jsou pak rozměry tohoto dimeru přibližně 70 x 50 Å.

Závěrem můžu konstatovat, že předkládaná dizertační práce splňuje všechny požadavky Oborové rady biochemie a patobiochemie a proto ji doporučuji k obhajobě. Současně přeji Mgr. Daně Veisové hodně úspěchů v dalším profesním i osobním životě.



RNDr. Cyril Bařinka, PhD

Laboratoř Strukturní Biologie

Biotechnologický ústav AV ČR

V Praze, 17. říjen, 2013