

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 (NthI). Proteiny Bmh jsou kvasinkové homology lidských protein 14-3-3, které hrají důležitou roli v řadě biologických procesů včetně přenosu signálů, diferenciaci a proliferaci, regulaci 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 proteinu 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 mutagenese), 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 zjednodušuje oponenturu, jelikož by bylo zbytečné znovu 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 zvyšují afinitu k Bmh přibližně 50-ti 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 fosforylovaný 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 μ M, 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 teoretickými 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 květetě? 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 rentgenostrukturní 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.

V Praze, 17. říjen, 2013



RNDr. Cyril Bařinka, PhD

Laboratoř Strukturní Biologie

Biotechnologický ústav AV ČR